

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica en la colestasis
microquirúrgica experimental: alteraciones metabólicas y
vasculares**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Nieto Moral

Directores

María Ángeles Aller Reyero

Javier Blanco Rivero

Alejandro Higuera Matas

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA AGUDA - SOBRE - CRÓNICA
EN LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA
EXPERIMENTAL: ALTERACIONES METABÓLICAS Y
VASCULARES**

TESIS DOCTORAL

CARLOS NIETO MORAL

DIRECTORES

María Ángeles Aller Reyero
Javier Blanco Rivero
Alejandro Higuera Matas

MADRID, 2017

Agradecimientos

Para Isa, mamá, papá, abuela y yaya

AGRADECIMIENTOS

A *Isa* por su comprensión, apoyo *incondicional y diario*, por sus *ánimos y consejos*, durante tanto tiempo.

A *mamá y papá*, por vuestra ayuda, *por estar ahí siempre* para todo lo que he necesitado y en cualquier momento, por vuestros consejos.

Para la *abuela* y para la *yaya*, por su gran ayuda con conocimiento o sin ello, desde aquí o desde otro lugar, por ser tan necesarias e importantes.

Al resto de *familia*, por ser tan comprensivos con mis periodos de *desaparición prolongada*.

A los *amigos*, por haberme *aguantado* durante todos estos años, en especial Adrián y Jorge.

A mis *tres directores*: que decir tiene que sin ellos no hubiera podido realizar este trabajo. Son tantas las cosas a agradecer que seguro que se me olvida algo... M^a Ángeles, Javier, Alejandro gracias por compartir vuestro conocimiento conmigo, por vuestra paciencia y tiempo empleado en esta tesis con lo importante que es el tiempo, por la realización de experimentos, las reuniones, los e-mails, por comprender mi situación externa a la universidad, por las clases, las correcciones, etc.

A los “*jefes*” de mis directores. Al *Profesor Jaime Arias* por compartir su conocimiento conmigo, ser guía científica y apoyar este proyecto. A la *Profesora Gloria Balfagón* por respaldar esta idea y aportar lo necesario para su realización, y al *Profesor Emilio Ambrosio* por apoyar este trabajo y facilitar lo necesario para llevarlo a cabo.

Al personal de la Universidad Complutense de Madrid que ha colaborado, destacando a Carlos Gilsanz e Isabel Prieto. Carlos un buen compañero y profesor, compartiendo tantas horas en el animalario...

Al personal del animalario y de otras instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en particular a Laura Caracuel y a Esther Sastre, por su gran ayuda e implicación en tantas fases de la experimentación.

Al personal de la UNED y concretamente a Alberto Marcos Bermejo, Marcos Ucha Tortuero y Raquel Santos Toscano, por su interés y complicidad, haciendo posible esta tesis.

A Marisa, *gran Bibliotecaria*, que tanta ayuda me ha prestado en esa ardua labor de recopilación de información.

A Alfonso e Inmaculada, por su necesaria ayuda.

A todas las personas que de una manera u otra han participado en esta pequeña contribución científica, que no he sabido recompensar en los agradecimientos, gracias.

Abreviaturas

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

α -SMA: *Actin of smooth muscle*, actina de músculo liso alfa

A: Adrenalina

aa: Aminoácidos

AAA: Aminoácidos aromáticos

AASLD: Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ACLF: *Acute-on-chronic liver failure*, insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica

ACA: Arteria cerebral anterior

ACM: Arteria cerebral media

ACP: Arteria cerebral posterior

ADP: Adenosín difosfato

ALF: *Acute liver failure*, insuficiencia hepática aguda

Ang II: Angiotensina II

ANOVA: Análisis de la Varianza

APASL: Asociación para el Estudio de Enfermedades del Hígado

ATP: Adenosín trifosfato

AUC: *Area under the curve*, área bajo la curva

BBB: *Blood brain barrier*, barrera hematoencefálica

BCAA: *Branched chain amino acids*, aminoácidos de cadena ramificada

BDL: *Bile duct ligation*, ligadura del conducto biliar

BH₄: Tetrahidrobiopterina

BK: *Bradykinin*, bradiquinina

Abreviaturas

BSA: *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino

Células NK: Células *natural killer*

CER: Área de circulación colateral esplenorrenal

6-ceto PGF_{1α}: 6-ceto prostaglandina F_{1α}

CM: Colestasis extrahepática microquirúrgica

COX: Ciclooxygenasa

CPE: Área de circulación colateral paraesofágicos

CPR: Área de circulación colateral pararectal

DA: Dopamina

DAMPs: *Molecular patterns associated with damage/danger*, patrones moleculares asociados a daño/peligro

DM-CD: Heptakis-2,6-O-dimetil-β-ciclodextrina

EASL: Asociación Europea para el Estudio del Hígado

ECE: Enzima conversora de endotelina

EDHF: *Endothelium derived hyperpolarizing factor*, factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EEM: Error Estándar de la media

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

ET-1: Endotelina 1

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FELASA: Federación Europea de Asociaciones de Animales de Laboratorio

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FMN: Flavín mononucleótido

FXR: Receptor nuclear farnesoide X

g: Constante de gravitación universal

GABA: Ácido gammaaminobutírico

GAD: Glutamato descarboxilasa

GDH: Glutamato deshidrogenasa

GPT: Glutamato piruvato transaminasa

HE: *Hepatic encephalopathy*, encefalopatía hepática

HEPES: 4-(2hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HP-CD: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

5-HT: Serotonina

HTP: Hipertensión portal

IgA: Inmunoglobulina A

IL: Interleuquina

KHS: Solución Krebs-Henseleit

LDH: Lactato deshidrogenasa

LM: Lóbulo hepático medio

LLD: Lóbulo hepático lateral derecho

LLI: Lóbulo hepático lateral izquierdo

LC: Lóbulo caudado

LPS: Lipopolisacárido

MHE: *Minimal hepatic encephalopathy*, encefalopatía hepática mínima - moderada

MOF: *Multiorgan failure*, fracaso multiorgánico

NA: Noradrenalina

Na₂ EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético disódico

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótico oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótico reducida

Abreviaturas

NMDA: Receptor N-Metil-D-aspartato

NO: *Nitric oxide*, óxido nítrico

NOS: *Nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintasa

eNOS: *Endothelial nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintasa endotelial

iNOS: *Inducible nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintasa inducible

nNOS: *Neuronal nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintasa neuronal

NTCP: Polipéptido cotransportador de taurocolato sódico

O₂^{•-}: Aniones superóxido

PAMPs: *Molecular patterns associated with pathogens*, patrones moleculares asociados a patógenos

PBE: *Spontaneous bacterial peritonitis*, peritonitis bacteriana espontánea

PCI: Peso corporal inicial

PCF: Peso corporal final

ΔPC: Incremento de peso corporal

PDGF: *Platelet-derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PG: Prostaglandina

PGH₂: Prostaglandina H₂

PGI₂: Prostaciclina I₂

PGI₂S: Prostaglandina I₂ Sintasa

PH: Peso hepático total

PKC: *Protein kinase C*, proteína quinasa C

p.o.: Postoperatorio

PRRs: *Pattern recognition receptors*, receptores de reconocimiento de patrones

PS: Pseudo-operación

PVDF: *Polyvinylidene difluoride*, membrana de difluoruro de polivinilideno

RFUs: *Relative fluorescence units*, unidades de fluorescencia relativa

RLO: Radicales libres de oxígeno

S1: Sobrenadante primero

S2: Sobrenadante segundo

SDS: Dodecil-sulfato sódico

SNC: Sistema nervioso central

TBS: *TRIS-buffered saline*, tampón salino con Tris

TCA: *Tricarboxylic acid cycle*, *Ciclo de los ácidos tricarboxílicos* o *Ciclo de Krebs*

TGF- β : *Tissue growth factor β* , factor de crecimiento tisular β

TH: Tampón de homogeneización

THDOC: (alo) Tetrahidrodesoxicorticosterona

TMB: Tetrametilbenzidine

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TPSO: Proteína translocadora

Tris: Trishidroximetilaminometano

TX: Tromboxano

TXA₂S: Tromboxano A₂ Sintasa

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento vascular endotelial

VHA, B, C, E: Virus de la hepatitis A, B, C, E

Índice

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ÍNDICE

RESUMEN

OVERVIEW

INTRODUCCIÓN	3
A/ COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA. ASPECTOS CLÍNICOS, IMPORTANCIA Y REPERCUSIÓN.....	3
A. 1. Aspectos generales, importancia y repercusión en salud pública	3
A. 2. Colestasis extrahepática: definición y etiología.	5
A. 3. Insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica	7
A. 4. Complicaciones de la colestasis extrahepática	11
A. 4.A. Hipertensión portal	11
A. 4.B. Infecciones	13
B/ VASCULOPATÍA: ARTERIOPATÍA EN LA INSUFICIENCIA HEPÁTICA	14
B. 1. Generalidades	14
B. 1.A. Estructura de la pared arterial.....	17
B. 2. Mediadores del tono vascular	19
B. 2.A. Óxido nítrico.....	19
B. 2.B. Prostanoides; Prostaciclina	21
B. 2.C. Tromboxano A₂.....	22
B. 2.D. Endotelina-1	23
C/ ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.....	25
C. 1. Generalidades	25
C. 1.A. Formas de clasificación	26
C. 1.B. A nivel epidemiológico y de salud pública	28
C. 1.C. Clínica.....	28
C. 1.D. Etiología. Fisiopatogenia. Consecuencias y alteraciones.....	29
C. 2. Neurotransmisión.....	33
C. 2.A. Generalidades	33
C. 3. Neurotransmisores implicados	35
C. 3.A Glutamato.....	35
C. 3.B. Ácido gammaaminobutírico	38
C. 3.C. Otros neurotransmisores: dopamina, serotonina, adrenalina, noradrenalina.	44
C. 4. Desequilibrio en aminoácidos plasmáticos.....	44
C. 4.A. Características bioquímicas de los aminoácidos.....	44

D/ MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA.....	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS.....	58
A/ OBJETIVOS PRINCIPALES	58
B/ OBJETIVOS SECUNDARIOS	58
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1.- MATERIAL	61
1. A. ANIMALES	61
1. B. INSTALACIONES.....	61
1. B.1. Animalario.....	61
1. B.2. Sala de operaciones.....	62
1. B.3. Sala de evolución postoperatoria.....	63
1. B.4. Sala de sacrificio y procesamiento de muestras	63
1. B.5. Área de conservación de muestras	63
1. B.6. Eliminación de residuos biológicos	64
1. B.7. Laboratorio de fisiología vascular.....	64
1. B.8. Laboratorio de neurobiología y neuroquímica	64
1. C. FÁRMACOS	65
1. C.1 Anestésicos	65
1. C.2 Otros fármacos	65
1. D. INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO	65
1. D.1.Caja de instrumental de microcirugía inventariable	65
1. D.1. A. Pinzas.....	65
1. D.1. B. Porta-agujas	66
1. D.1. C. Tijeras	66
1. D.2. Material de sutura y ligadura.....	66
1. D.3. Material quirúrgico complementario	66
1. D.4. Otros materiales para el procedimiento quirúrgico y la extracción de muestras	67
1. D.5. Equipo de laboratorio	68
1. D.6. Reactivos: estudio vascular.....	69
1. D.7. Reactivos: estudio de neuroaminoácidos.....	71
1. D.7. A. Tratamiento muestras de tejido cerebral.....	71
1. D.7. B. Tratamiento de muestra de plasma	71
2.- MÉTODOS	72
2. A. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	72

2. B. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	73
2. B.1. Condiciones de utilización, cría y estabulación de los animales.....	73
2. B.1. A Cría y estabulación	73
2. B.2. Normativa para la cría, cuidado y empleo de animales de experimentación	74
2. C. TÉCNICA ANESTÉSICA	75
2. D. TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	76
2. D.1. Pseudo-operación.....	76
2. D.2. Colestasis extrahepática microquirúrgica.....	78
2. E. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO.....	84
2. F. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES	85
2. F.1. Circulación colateral portosistémica.....	86
2. F.2. Vasculopatía venosa mesentérica	87
2. F.3. Extracción sanguínea.....	88
2. F.4. Recogida del hígado	89
2. F.5. Extracción cerebral y de arteria cerebral media	89
2. F.6. Disección de núcleos cerebrales	90
2. F.7. Eliminación de los restos biológicos	92
2. G. ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS EN ARTERIAS CEREBRALES	92
2. G.1. Colección de muestras.....	92
2. G.2. Protocolos utilizados para la determinación de cada metabolito problema. Empleo de los kits comerciales correspondientes	93
2. G.2. A. Determinación de óxido nítrico	93
2. G.2. B. Determinación de TXA ₂ y de PGI ₂	93
2. G.2. C. Determinación de Endotelina 1	94
2. H. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS	95
2. H.1. Preparación de muestras	95
2. H.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	96
2. H.3. Electrotransferencia y detección inmunológica.....	96
2. I. ESTUDIO DE REACTIVIDAD VASCULAR	98
2. I.1. Preparación y montaje	98
2. I.2. Desarrollo del experimento de reactividad vascular	99
2. J. DETERMINACIÓN AMINOÁCIDOS EN TEJIDO CEREBRAL Y EN PLASMA.....	100
2. J.1. Técnica para la determinación de aminoácidos	100
2. K. DETERMINACIÓN DE AMINOACIDOS EN TEJIDO CEREBRAL	102

2. K.1. Disección de muestras de cerebro	102
2. K.2. Procesado de muestras de tejido cerebral.....	102
2. K.2. A. Homogenización.....	102
2. K.2. B. Filtración.....	103
2. K.2. C. Derivatización de muestras y patrones	103
2. L. DETERMINACIONES AMINOACIDOS EN PLASMA	106
2. L.1. Obtención y preparación de muestras de plasma.....	106
2. L.2. Procesado de muestras de plasma	106
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
3. A. ANÁLISIS DE DATOS RELATIVOS A PARÁMETROS MACROSCÓPICOS	107
3. B. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS Y DE LOS EXPERIMENTOS DE REACTIVIDAD VASCULAR	108
3. C. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL ESTUDIO DE NEUROTRANSMISORES CEREBRALES, AMINOÁCIDOS CEREBRALES Y PLASMÁTICOS.....	109
RESULTADOS	113
A. MODELO EXPERIMENTAL. TÉCNICA QUIRÚRGICA: COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA. RESULTADOS DE PARÁMETROS MACROSCÓPICOS.....	113
A. 1. Análisis de supervivencia.....	114
A. 2. Complicaciones durante el postoperatorio	114
A. 3. Ascitis.....	115
A. 4. Circulación colateral.....	116
A. 5. Vasculopatía venosa mesentérica.....	117
A. 6. Evolución peso corporal	118
A. 7. Peso hepático total.....	120
A. 8. Peso de los diferentes lóbulos hepáticos	122
B. RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE FACTORES VASOACTIVOS Y DE CONTRACTILIDAD A NIVEL VASCULAR, EN ARTERIA CEREBRAL MEDIA.....	126
B. 1. Liberación de nitritos.....	126
B. 2. Análisis de la expresión de las distintas isoformas de NOS.....	127
B. 2.A. Análisis de la expresión de iNOS total	127
B. 2.B. Análisis de la expresión de eNOS total y fosforilada	128
B. 2.C. Análisis de la expresión de nNOS total y fosforilada.....	129
B. 3. Producción de prostanoïdes	130
B. 3.A. Liberación de 6-ceto prostaglandina F _{1α}	130
B. 3.B. Liberación de Tromboxano B ₂	131
B. 4. Análisis de la expresión de las isoformas de Ciclooxygenasa	132

B. 4.A. Análisis de la expresión de Ciclooxygenasa-1	132
B. 4.B. Análisis de la expresión de Ciclooxygenasa-2.....	133
B. 5. Expresión de Prostaglandina I ₂ Sintasa y Tromboxano A ₂ Sintasa.....	134
B. 5.A. Análisis de la expresión de Prostaglandina I₂ Sintasa.....	134
B. 5.B. Análisis de la expresión de Tromboxano A₂ Sintasa.....	135
B. 6. Liberación de Endotelina-1	136
B. 7. Expresión de Enzima Conversora de Endotelina 1	137
B. 8. Respuesta vasoconstrictora a KCl	138
B. 9. Relajación a bradiquinina dependiente de endotelio	139
C. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS/ NEUROTRANSMISORES EN TEJIDO CEREBRAL Y PLASMA.....	140
C. 1. Resultados determinación de aminoácidos en núcleos encefálicos.....	140
C. 1.A. Inspección macroscópica de cerebro	140
C. 1.B. Cerebelo	141
C. 1.C. Núcleo Estriado Dorsal	142
C. 1.D. Hipotálamo	144
C. 2. Resultados determinación de aminoácidos en plasma.....	145
C. 3. Relaciones entre aminoácidos. Ratios	147
C. 3.A. Ratios Cerebelo	148
C. 3.B. Ratios Núcleo Estriado Dorsal.....	149
C. 3.C. Ratios Hipotálamo	150
C. 3.D. Ratios Plasma	151
DISCUSIÓN.....	155
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA.....	187

Resumen

RESUMEN

Introducción. Se ha realizado un estudio de la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica utilizando un modelo experimental colestásico para analizar la vasculopatía cerebral y el metabolismo cerebral de los aminoácidos. La encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica es una patología, secundaria a la insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica, que aún no ha sido bien caracterizada y entre cuyos factores etiopatogénicos se podrían encontrar la vasculopatía arterial sistémica y las alteraciones de los aminoácidos en el sistema nervioso central, motivo por el cual, los objetivos principales de este trabajo son esos dos aspectos, analizando para ello, las posibles alteraciones de factores vasoactivos en las arterias cerebrales, su repercusión sobre la arteria cerebral media y las concentraciones de aminoácidos en distintas áreas cerebrales y en el plasma.

Material y Métodos. Para verificar esta hipótesis se diseñó un estudio experimental en ratas Wistar: un primer grupo control constituido por ratas *pseudo-operadas* ($n=8$), y otro compuesto por ratas con *colestasis extrahepática microquirúrgica* ($n=10$). La colestasis extrahepática microquirúrgica, que consiste en la resección de la vía biliar extrahepática, previa ligadura de la misma a nivel del hilio de cada uno de los lóbulos hepáticos hasta el inicio de la porción intrapancreática del colédoco, es un modelo experimental que ha demostrado su validez para el estudio de esta patología. Como terapia analgésica se administró el opioide Buprenorfina (0,05 mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas del postoperatorio. Durante toda la evolución postoperatoria se administraron por vía intramuscular profunda Ceftazidima (50 mg/kg; dos veces a la semana) y vitamina K1 (Fitomenadiona; 8 mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y

Resumen

anti-hemorrágica, respectivamente. Los animales de ambos grupos fueron sacrificados a las 8 semanas de la intervención quirúrgica, determinándose la presencia de ascitis, el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica, de hipertensión portal y de vasculopatía venosa mesentérica. Se registró el peso del hígado, y en el cerebro se disecaron tanto las arterias cerebrales, para determinar la liberación de factores vasoactivos y evaluar la función vascular, especialmente en la arteria cerebral media, como ciertos núcleos cerebrales, concretamente el cerebelo, el núcleo estriado dorsal y el hipotálamo, para determinar su concentración de aminoácidos. También se cuantificaron las concentraciones de los mismos aminoácidos en sangre periférica. Mediante la técnica de *ELISA* se determinó la liberación de factores vasoactivos, mediante el procedimiento de *Western Blot* se cuantificó la expresión de proteínas, y para estudiar el estado de la función vascular se empleó el método de Mulvany y Halpern (1977). La determinación de las concentraciones de aminoácidos en los núcleos cerebrales y en sangre periférica se realizó mediante electroforesis capilar.

Resultados. La supervivencia global de ambos grupos fue del 100%. Todos los animales colestásicos presentaron ascitis, circulación venosa colateral en las áreas esplenorrenal, gastroesofágica y pararrectal, así como vasculopatía venosa mesentérica de grado II. Respecto del peso corporal final, fue mayor ($p < 0,0001$), en las ratas pseudooperadas que en las colestásicas, por el contrario el peso hepático fue mayor ($p < 0,001$) en el grupo de colestasis, por lo que la relación entre el peso hepático y el peso corporal final fue superior ($p < 0,0015$) en las ratas con colestasis. En cuanto a la determinación de factores vasoactivos y el análisis de la función vascular, en primer lugar, en el grupo de animales con colestasis se ha encontrado un incremento ($p < 0,05$) de nitritos y de ciertas enzimas implicadas en su síntesis,

como la óxido nítrico-sintasa inducible ($p<0,05$), la óxido nítrico-sintasa endotelial total ($p<0,05$) y la fosforada ($p<0,05$). Por el contrario, ni las concentraciones arteriales de óxido nítrico-sintasa neuronal total ni de la fracción fosforilada sufrieron variaciones. En segundo lugar, en relación a la obtención de prostanoides, la producción de 6-ceto-Prostaglandina $F_{1\alpha}$ aumentó ($p<0,05$) en las ratas colestásicas, pero no se observaron diferencias entre grupos en la síntesis de Tromboxano B_2 . Cuando se analizó la expresión de las isoformas del enzima Ciclooxygenasa, la Ciclooxygenasa-1 no cambió de forma estadísticamente significativa, pero en la Ciclooxygenasa-2 se encontró una mayor expresión ($p<0,05$) en el grupo de animales colestásicos. En la expresión de Prostaglandina I_2 -sintasa y de Tromboxano A_2 -sintasa no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. En tercer lugar, la concentración de Endotelina-1 y la expresión de la Enzima Convertidora de Endotelina disminuyeron ($p<0,05$) en las ratas con colestasis. En cuarto lugar, se estudiaron parámetros relacionados con la función vascular, como la vasoconstricción inducida por cloruro potásico, que fue similar en ambos grupos de estudio, y la relajación secundaria a Bradiquinina dependiente de endotelio en segmentos de arteria cerebral media precontraídos con Serotonina, que fue mayor ($p<0,05$) en las ratas colestásicas. En relación a la determinación de aminoácidos en el parénquima cerebral y en el plasma, se determinaron un total de ocho aminoácidos (L-Glutamato, L-Aspartato, Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina, L-Arginina y Ácido Gamma-Aminobutírico) en diferentes núcleos cerebrales (cerebelo, núcleo estriado dorsal e hipotálamo), y siete en plasma (L-Glutamato, L-Aspartato, Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina y L-Arginina). En el cerebelo se demostró un incremento ($p<0,05$) del ácido gamma-aminobutírico en el grupo de ratas colestásicas. En el núcleo estriado dorsal se halló una tendencia ($p=0,08$) al

Resumen

descenso de ácido gamma-aminobutírico, así como, de L-Glutamato y L-Aspartato en el grupo de animales colestásicos. En el hipotálamo no se establecieron diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, es en plasma donde se encontró un mayor número de diferencias en los aminoácidos estudiados. Así, en el grupo de ratas colestásicas se halló un incremento ($p<0,05$) de glicina, de L-Alanina y de L-Serina, una tendencia al aumento ($p=0,065$) de L-Arginina y una menor ($p<0,05$) concentración de L-Glutamato. Se completó el estudio con la obtención de ratios entre aminoácidos; en los núcleos cerebrales se establecieron el ratio glutamato/taurina y el ratio glicina/taurina, sin hallar diferencias en ninguno de los núcleos estudiados. En el plasma se analizaron los dos ratios anteriormente mencionados y el ratio glutamato/alanina; en el grupo de animales con colestasis se obtuvo un descenso ($p<0,05$) del valor del ratio de glutamato/taurina y de glutamato/alanina, así como, una tendencia al aumento ($p=0,057$) del ratio glicina/taurina.

Conclusiones. La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata permite obtener un modelo experimental de insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica con el cual estudiar la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica. Este tipo de insuficiencia hepática origina, tanto en la circulación esplácnica como en la sistémica, un desequilibrio entre factores vasomotores vasodilatadores y vasoconstrictores a favor de los primeros, que podría contribuir al desarrollo de circulación hiperdinámica sistémica, afectando también al sistema nervioso central, y que contribuiría al establecimiento de un estado proinflamatorio sistémico, en probable relación con la hiperamonemia y ciertos desequilibrios en el sistema inmune, alterando todo ello la barrera hematoencefálica y produciendo edema cerebral. Todo ello generaría un ambiente hipóxico en torno a la neurona, causado

por disminución de aporte sanguíneo, por la mayor dificultad de difusión del oxígeno en el parénquima cerebral y por las alteraciones de la barrera hematoencefálica. Esto obligaría a la célula cerebral a generar energía mediante un metabolismo anaerobio, consistente en la glucolisis anaerobia y en el catabolismo de aminoácidos glucogénicos, en lugar de aplicar la ruta metabólica fisiológica de fosforilación oxidativa. Esta alteración metabólica, denominada anaplerosis, consiste en la síntesis *de novo* de mediadores del ciclo de Krebs para reponer las pérdidas energéticas, empleando rutas metabólicas menos habituales. Por ello, la demostración en este modelo experimental de un incremento de las concentraciones plasmáticas de aminoácidos glucogénicos, en particular glicina, alanina y serina, así como el hallazgo en el cerebro, en concreto en el núcleo estriado dorsal, de la disminución de ácido gamma-aminobutírico, L-Glutámico y L-Aspártico, serían dos hallazgos que contribuirían a caracterizar este tipo de encefalopatía hepática. En conclusión, las alteraciones cerebrales, tanto vasculares como metabólicas, demostradas en este estudio contribuyen a una mejor interpretación etiopatogénica de la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica experimental, siendo necesarios nuevos ensayos clínicos sobre esta área de conocimiento para continuar la caracterización de esta grave y común entidad nosológica.

Palabras clave: encefalopatía hepática; insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica; hipertensión portal; microcirugía; circulación sanguínea hiperdinámica; vasculopatía; aminoácidos cerebrales; aminoácidos plasmáticos; anaplerosis.

Overview

OVERVIEW

Introduction. A study of the acute-on-chronic Hepatic Encephalopathy, has been carried out by using an experimental cholestatic model to analyse the cerebral vascular disease and cerebral metabolism of amino acids. Acute-on-chronic Hepatic Encephalopathy is a pathology, secondary to acute-on-chronic liver failure, which has not yet been well characterized and among whose etiopathogenetic factors could be used to find systemic arterial vascular disease and alterations of amino acids in the central nervous system. The main objectives of this work focus on the possible alterations of vasoactive factors in cerebral arteries and its impact on the middle cerebral artery, and the concentrations of amino acids in different brain areas and in the plasma.

Material and methods. To verify this hypothesis, an experimental study on Wistar rats was designed: a first control group constituted by rats *pseudo-operated* ($n = 8$), and another compound by rats with *Microsurgical extrahepatic cholestasis* ($n = 10$). Microsurgical extrahepatic cholestasis consists of the extrahepatic bile duct resection, after ligation of the same at the level of the hilum of each of the hepatic lobules until the start of the intrapancreatic portion of the common bile duct. This is an experimental model that has proven its validity to the study of this disease. Opioid buprenorphine (0, 05mg/kg/12 h) was administered subcutaneously as analgesic therapy during the first 24 hours of the postoperative period. Throughout the postoperative time-period, Ceftazidime (50 mg/kg; twice a week), and Vitamin K1 (Phytonadione, 8 mg/kg, once a week) were administered respectively via a deep intramuscular injection as an anti-infectious and anti-hemorrhagic prophylaxis. The animals of both groups were sacrificed 8 weeks after surgery, determining the

Overview

presence of ascites, the development of collateral circulation port-systemic, hypertension portal, and of Mesenteric Venous Thrombosis. In order to determine its concentration of amino acids, the liver weight was registered, and in the brain, both cerebral arteries were dissected. This was performed in order to release vasoactive factors and evaluate the vascular function, especially in the middle, and certain brain nuclei cerebral artery, specifically the cerebellum, the dorsal striatum nucleus and the hypothalamus. The concentrations of the same amino acids in peripheral blood were also quantified. The *ELISA* technique was used to determine the release of vasoactive factors. Protein expression was quantified using the *Western Blot* method and the method of Mulvany and Halpern (1977) was used to study the state of vascular function. The determination of the concentrations of amino acids in the brain nuclei and peripheral blood were performed using capillary electrophoresis.

Results. Overall, the survival in both groups was 100%. All cholestatic animals had ascites, collateral in the splenorenal, gastroesophageal, and pararectal areas, and Grade II Mesenteric Venous Thrombosis. The final body weight was higher ($p < 0.05$) in pseudo-operated rats than in the cholestatic ones, however, the liver weight was higher ($p < 0.05$) in the cholestasis group, resulting in the relationship between the liver weight and final body weight being higher ($p < 0.05$) in cholestatic rats.

First of all, with regard to the determination of vasoactive factors and the vascular function analysis of the group of animals with cholestasis, an increase of nitrites and these enzymes involved in its synthesis were found ($p < 0.05$): oxide nitric-synthase inducible ($p < 0.05$), the oxide nitric-synthase endothelial total ($p < 0.05$) and the phosphorylated ($p < 0.05$). On the contrary, neither arterial concentrations of total neuronal Nitric Oxide synthase, nor the phosphorylated

fraction suffered variations. Secondly, in relation to the obtaining of prostanoids, the production of 6-Keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ increased ($p < 0,05$) in cholestatic rats, but there were no differences between groups in the synthesis of thromboxane B_2 . When the expression of the isoforms of the enzyme cyclo-oxygenase were tested, from a statistical point of view, the cyclooxygenase-1 did not change significantly. However, in the group of cholestatic animals, a greater expression of cyclooxygenase-2 ($p < 0,05$) was found. Statistically speaking, there were no significant differences in the expression of prostaglandin I_2 - synthase and thromboxane A_2 - synthase. Thirdly, the concentrations of endothelin-1 and the expression of the enzyme converting of endothelin-1 decreased ($p < 0.05$) in the rats with cholestasis. Furthermore, we studied parameters related to vascular function, such as vasoconstriction induced by potassium chloride. This was similar in both groups, and the secondary Bradykinin-induced relaxation serotonin-precontracted segment of the endothelium-dependent middle cerebral artery, was more ($p < 0,05$) in cholestatic rats. In relation to the determination of amino acids in the brain parenchyma and plasma, a total of eight amino acids were identified (L-glutamate, L-aspartate, taurine, glycine, L-alanine, L-serine, L-arginine, and gamma-aminobutyric acid) in different brain nuclei (cerebellum, striatum and dorsal nucleus and hypothalamus). As well as seven in plasma (L-glutamate, L-aspartate, taurine, glycine, L-alanine, L-serine and L-arginine). The cerebellum showed an increase ($p < 0,05$) of the gamma-aminobutyric acid in the cholestatic rat group. Grooved dorsal nucleus found a trend ($p = 0, 08$) to the descent of the gamma-aminobutyric acid and L-glutamate and L-aspartate in the Group of cholestatic animals. When looking at the statistics, no significant differences were established in the hypothalamus. Finally, a large number of differences were found in the amino acids in the plasma. Thus, the group of

Overview

cholestatic rats highlights an increase ($p < 0.05$) of glycine, L-alanine and L-serine, an increase ($p = 0,065$) of L-arginine and a minor ($p < 0.05$) concentration of L-glutamate. After completing the study of obtaining ratios between amino acids, the glutamate/taurine ratio and the ratio of glycine/taurine in the cerebral nuclei was established without any differences in any of the studied nuclei. The two ratios mentioned and the ratio of glutamate/alanine were analyzed in the plasma. In the group of animals with cholestasis, the level obtained was ($p < 0,05$), underlining a decrease in the value of the ratio of glutamate/alanine and glutamate/taurine, as well as an increase ($p = 0,057$) of the glycine/taurine ratio.

Conclusions. Microsurgical extrahepatic cholestasis in rats allows for an experimental model of acute-on-chronic liver failure, in order to study the acute-on-chronic liver encephalopathy. This type of liver failure causes an imbalance between vasodilating and vasoconstricting vasomotor factors, both in the splanchnic circulation and systemic. Moreover, this could contribute to the development of systemic hyperdynamic circulation, affecting the central nervous system, contributing to the establishment of a systemic pro-inflammatory state. This could be related to the hyperammonemia and certain imbalances in the immune system. Thus, altering all the blood-brain barrier and producing a cerebral edema. This would generate a hypoxic environment around the neuron, caused by a decrease in blood flow, a greater difficulty of oxygen diffusion in the cerebral parenchyma and alterations of the blood-brain barrier. Instead of applying the physiological metabolic pathway of oxidative phosphorylation, this would force the brain cell to generate energy through anaerobic metabolism, anaerobic glycolysis, and catabolism of glucogenic amino acids. This metabolic alteration, called anaplerosis, consists of the synthesis of *new* mediators of the Krebs cycle to replenish the energy losses, using less common

metabolic pathways. Therefore, the demonstration in this experimental model, plasma glucogenic amino acid concentrations increased. In particular, glycine, alanine, and serine. Two findings which would help characterize this type of hepatic encephalopathy can be located when looking at the brain related results, particularly in the striatum dorsal nucleus. It can be noted that there is a decrease in gamma-aminobutyric acid, glutamic and aspartic-L. In conclusion, both the vascular and metabolic brain alterations demonstrated in this study contribute to a better interpretation of etiopathogeny of acute-on-chronic experimental hepatic encephalopathy. New clinical trials must continue to be carried out in this field to continue the characterization of this serious and common nosological entity.

Key words: hepatic encephalopathy, acute-on-chronic liver failure, hypertension portal; microsurgery hyperdynamic circulation; vascular disease; cerebral amino acids, plasma amino acids; anaplerosis.

Introducción

INTRODUCCIÓN

A/ COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA. ASPECTOS CLÍNICOS, IMPORTANCIA Y REPERCUSIÓN.

A. 1. Aspectos generales, importancia y repercusión en salud pública

La colestasis hepática es un síndrome ampliamente caracterizado que puede ser generado por diversas entidades nosológicas (Rodríguez-Garay 2003). Se define como una alteración en el drenaje biliar en el intestino (Gossard 2013) o en la formación de bilis por el hígado (Pollheimer et al. 2014) y se clasifica en extrahepática e intrahepática (Jüngst et al. 2013; Vilstrup et al. 2014). La causa de la colestasis intrahepática está en el hígado mientras que el término extrahepático implica la obstrucción de la vía biliar fuera del parénquima hepático (Li et al. 2004; Hirschfield et al. 2010).

La colestasis provoca insuficiencia hepática. El *impacto clínico* de la insuficiencia hepática es relevante porque la prevalencia mundial de cirrosis está aumentando y porque, a su vez, es la principal causa de carcinoma hepatocelular (Russo et al. 2012). Se estima que aproximadamente 180 millones de pacientes sufren insuficiencia hepática crónica en el mundo. Los datos epidemiológicos demuestran un preocupante incremento de cirrosis hepática secundaria a infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), por el consumo de alcohol y por la esteatosis hepática (Poynard et al. 1997; Parola et al. 2009), constituyendo las causas fundamentales en los países occidentales. La hepatitis crónica por virus B y

C es también predominante en África y Asia. Otros factores como la obesidad y la diabetes aceleran la progresión o son causa propia de la patología hepática crónica (Novo et al. 2014).

Existe una entidad denominada *insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica (ACLF)*, que se define como una agresión aguda sobre el hígado que se manifiesta con ictericia y coagulopatía, complicándose a las cuatro semanas con ascitis y/o encefalopatía en paciente previamente afecto de insuficiencia hepática crónica (Wright et al. 2014; Bernal et al. 2015), constituyendo una entidad diferente de la descompensación hepática aguda. Tiene altas tasas de mortalidad a corto plazo y sucede en pacientes con insuficiencia hepática crónica pero no necesariamente con cirrosis establecida (Bernal et al. 2015)

La *encefalopatía hepática*, secundaria a la insuficiencia hepática, posee una importancia significativa porque el principal grupo que la desarrolla, en concreto la encefalopatía hepática mínima-moderada que es menos aguda en sus síntomas que la encefalopatía hepática aguda o fulminante, son los pacientes con daño hepático crónico pudiendo llegar a los 5,5 millones de individuos afectados sólo en EEUU (Felipo 2013). En los pacientes con ACLF, la *encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica* incrementa sustancialmente la incidencia de mortalidad (Romero-Gómez et al. 2015), llegando hasta un 53% en algunas series y un 89% en otras (Wright et al. 2014).

En términos globales de morbilidad más de un millón de muertes al año, un 2% del total, y 31.027.000 incapacidades ajustadas a los años de vida son secundarias a insuficiencia hepática crónica y cirrosis, siendo la producida por abuso de alcohol exclusivamente, responsable de 493.000 muertes anuales y de 14.544.000 incapacidades ajustadas a los años de vida (Rehm et al. 2013). Los

datos epidemiológicos predicen un repunte de incidencia de insuficiencia hepática descompensada y de carcinoma hepatocelular en la próxima década (Rehm et al. 2013; Rosselli et al. 2013), en paralelo con un descenso del número de hígados de donantes para trasplante hepático que, actualmente, es el único tratamiento eficaz para los enfermos cirróticos. La progresión de una insuficiencia hepática crónica hacia la cirrosis se produce al menos después de 10 a 15 años de evolución y, a veces requiere incluso hasta 30 años, pero puede ser extremadamente rápida en algunos tipos de patología hepática, en particular, en los niños con atresia biliar, en pacientes con recurrencia del VHC después del trasplante hepático o en pacientes co-infectados con virus de la hepatitis B y C (Friedman 2008; Rehm et al. 2013; Rosselli et al. 2013; Novo et al. 2014).

A. 2. Colestasis extrahepática: definición y etiología.

Respecto de la *colestasis extrahepática* en el ser humano está causada por la obstrucción mecánica de la vía biliar extrahepática, a nivel de los conductos hepáticos derecho e izquierdo, del conducto hepático común o del colédoco (Gossard 2013). Dicha obstrucción puede estar originada a su vez por malformaciones biliares (Nakamura et al. 2013), litiasis (Li et al. 2004; Hirschfield et al. 2010), tumores (Hirschfield et al. 2010) o compresión extrínseca de la vía biliar (Suárez et al. 2013) (Tabla 1). Con independencia de su etiología, la colestasis extrahepática se manifiesta clínicamente con ictericia, dolor abdominal, prurito, coluria y acolia (Imam et al. 2012; Gossard 2013).

Introducción

Tabla 1: Etiología de la colestasis extrahepática. Tomado de: *Diseases of the Liver and Biliary System*. Sherlock S Blackwell Scientific Publications 1989; 8ª Ed. 13: 248-272. (Sherlock, 1989).

- Atresia biliar extrahepática			
- Litiasis biliar			
- Lesiones inflamatorias:	* Colangitis esclerosante primaria y secundaria		
	* Estenosis postoperatorias: ^ Colédoco		
		^ Esfínter de Oddi	
* Biliopatía hipertensiva portal por obstrucción extrahepática de la vena porta:			* Pseudoquistes pancreáticos
			* Pancreatitis: ^ Aguda
			^ Crónica
- Tumores:	* Intrínsecos:	^ Benignos – Papilomas	
		^ Malignos – Colangiocarcinomas	
	* Extrínsecos:	^ Pancreáticos	
		^ Gástricos	
		^ Metástasis ganglionares hiliares hepáticas	
		^ Linfomas: Enfermedad de Hodgkin	
- Causas inusuales:	* Quistes del colédoco		
	* Abscesos amebianos		
	* Divertículos duodenales		
	* Infecciones parasitarias: Ascariasis, fascioliasis		
	* Hemobilia		

El hígado está compuesto por dos tipos de células epiteliales, los *hepatocitos* y los *colangiocitos*. Estos últimos, aunque sólo constituyen del 3 al 5% de todas las células del parénquima hepático, desarrollan un papel fisiológico clave durante el tránsito de la bilis a lo largo de la vía biliar, que implica la secreción y absorción de agua, electrolitos como el cloro y el bicarbonato, y de otros solutos orgánicos, principalmente la bilirrubina (Han et al. 2014; Pollheimer et al. 2014). En respuesta a la agresión, los colangiocitos liberan múltiples mediadores inflamatorios, tales como citoquinas y quimioquinas (TNF- α , IL-6, e IL-8), factores de crecimiento (PDGF, VEGF, TGF- β), morfógenos (*Hedgehog*, *Notch*), moléculas de adhesión con función autocrina/paracrina (Syal et al. 2012; O'Hara et al. 2013). Así, la modulación de la función y supervivencia de los colangiocitos favorece, tanto su proliferación, como la diferenciación de los fibroblastos portales y células estrelladas hepáticas en miofibroblastos, explicando la concomitante respuesta proliferativa biliar y fibrosante en la fibrosis/cirrosis biliar (Syal et al. 2012; Park 2012).

El hígado de la rata sufre marcadas alteraciones hemodinámicas, tanto portales como arteriales, que pueden comportar *lesiones por isquemia-reperfusión* y estrés oxidativo (Huang et al. 2009; Oguz et al. 2012; Lee et al. 2015). El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (HTP) (Van Steenkiste et al. 2010; Hsu et al. 2014) e isquemia hepática.

Se podría concluir que la colestasis extrahepática, comparte con otros tipos de colangiopatías la existencia de proliferación biliar, ductopenia por inhibición de la proliferación o por apoptosis, fibrosis biliar y carcinogénesis (Marzioni et al. 2010; Park 2012; Syal et al. 2012; O'Hara et al. 2013; Ramakrishna et al. 2013). Concretamente en la rata, causa fibrosis biliar y alteraciones hemodinámicas portales, esplácnicas y sistémicas, así como otras complicaciones extrahepáticas, tanto cardiovasculares, como renales inmunológicas y neurológicas (Kountouras et al. 1984; Aller et al. 2012; Hosseini et al. 2014). La fibrosis biliar en las ratas con ligadura del colédoco es progresiva durante las primeras tres semanas de evolución, si bien, se ha demostrado que a partir de la cuarta semana la rata sufre un cuadro similar al de *ACLF*.

A. 3. Insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica

El fracaso o insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica es una entidad clínica distinta de la insuficiencia hepática crónica y de la insuficiencia hepática aguda (Romero-Gómez et al. 2015; Sarin et al. 2016).

No existe un claro consenso al respecto de su caracterización pero podría definirse como una descompensación hepática aguda sobre la base de una

enfermedad hepática crónica, asociada a fracaso de algún otro órgano o sistema y con alta tasa de mortalidad a corto plazo, según algunos artículos mayor o igual a 15% en los primeros 28 días. En esencia, se define *descompensación hepática aguda* como el desarrollo de ascitis, encefalopatía, hemorragias digestivas y/o infecciones bacterianas, y *fracaso de algún órgano o sistema* se concreta como alteraciones en la función hepática, en la coagulación, en la función renal, alteración cerebral, del sistema respiratorio y/o circulatorio (Jalan et al. 2002; Jalan et al. 2011; Arroyo et al. 2015; Romero-Gómez et al. 2015; Sarin et al. 2016). El ACLF es especialmente prevalente en pacientes relativamente jóvenes, en torno a la quinta década de la vida, y con cirrosis (Rosselli et al. 2013) secundaria a alcoholismo y/o infección por VHB (Arroyo et al. 2015).

Fisiopatológicamente el ACLF se caracteriza por alteraciones en el tráfico del amonio, estrés oxidativo, inflamación y alteraciones en el gen de la glutaminasa, aumentando la glutamina en el interior de los astrocitos (Romero-Gómez et al. 2015). Existe un sinergismo entre el estado de hiperamonemia y el estado inflamatorio sistémico (Romero-Gómez et al. 2015), que se explicará en apartados sucesivos.

El mecanismo de actuación de la inflamación sistémica del ACLF se sostiene en tres pilares fundamentales. El primero sería la translocación al torrente sanguíneo de patrones moleculares asociados a patógenos procedentes de bacterias de la luz intestinal o la liberación de señales mediante patrones moleculares asociados a daño/peligro que producen las células que están muriendo o en apoptosis por el daño hepático causado, por ejemplo, por VHB o alcohol. El factor precipitante del cuadro de ACLF más frecuente son las infecciones (Jalan 2011), pero en hasta un 40% de los casos no se encuentra ninguno (Bernal et al. 2015). Los PAMPs o los

DAMPs son identificados por receptores de reconocimiento de patrones que poseen las células que forman parte del sistema inmune innato, resultando la activación de cascadas de señalización que inducen genes que codifican moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Cuando la respuesta inicial es excesiva, las citoquinas generadas son capaces de estimular a la enzima óxido nítrico sintasa inducible y consecuentemente se incrementa la síntesis de óxido nítrico a nivel de la pared de arteriolas sistémicas y de tejido cardíaco (Hollenberg et al. 2016). El efecto del NO genera daño en la función ionotrópica cardíaca y produce vasodilatación a nivel esplácnico y sistémico, disminuyendo la oxigenación de los tejidos (Hollenberg et al. 2016). Además, el endotelio microvascular de órganos vitales es blanco de componentes bacterianos y de tales moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas, lo que ocasiona por un lado microtrombosis vascular e hipoxia tisular y por otro lado afluencia de fagocitos, liberación de especies reactivas de oxígeno, daño tisular y fracaso orgánico (Arroyo et al. 2015a). Esto constituye el segundo pilar que participa en los mecanismos sistémicos de inflamación, el *estrés oxidativo*. Y el descenso de tolerancia a la inflamación que genera el estado basal de *inflamación moderada* que existe en estos pacientes, conforma el tercer elemento (Arroyo et al. 2015a; Romero-Gómez et al. 2015).

En resumen, las características clínicas y fisiopatológicas del ACLF se pueden resumir mediante el acrónimo inglés P.I.R.O. (*predisposition, injury, response, organ failure*) (Bernal et al. 2015): *Predisposición*, porque los pacientes que desarrollan ACLF según algunos estudios, son pacientes jóvenes y con cirrosis de origen alcohólico (Moreau et al. 2013). *Lesión o factor desencadenante*, que en hasta un 40% de los casos no es conocido, siendo el más frecuente entre los identificados la infección pero existiendo otros como la hemorragia por varices

Introducción

esofágicas, intervenciones quirúrgicas, fármacos hepatotóxicos, consumo agudo excesivo de alcohol, isquemia hepática por bajo gasto cardiaco, infección por virus de la hepatitis A o virus de la hepatitis E *Respuesta o reacción*, donde el marco principal del ACLF es una respuesta inflamatoria sistémica anormal caracterizada por una respuesta inicial de citoquinas proinflamatorias que se continúa con un periodo prolongado de “parálisis inmune” que predispone a infecciones secundarias. *Fracaso de algún órgano o sistema* siendo el parénquima hepático el probablemente afectado de forma más importante y temprana (Figura 1).

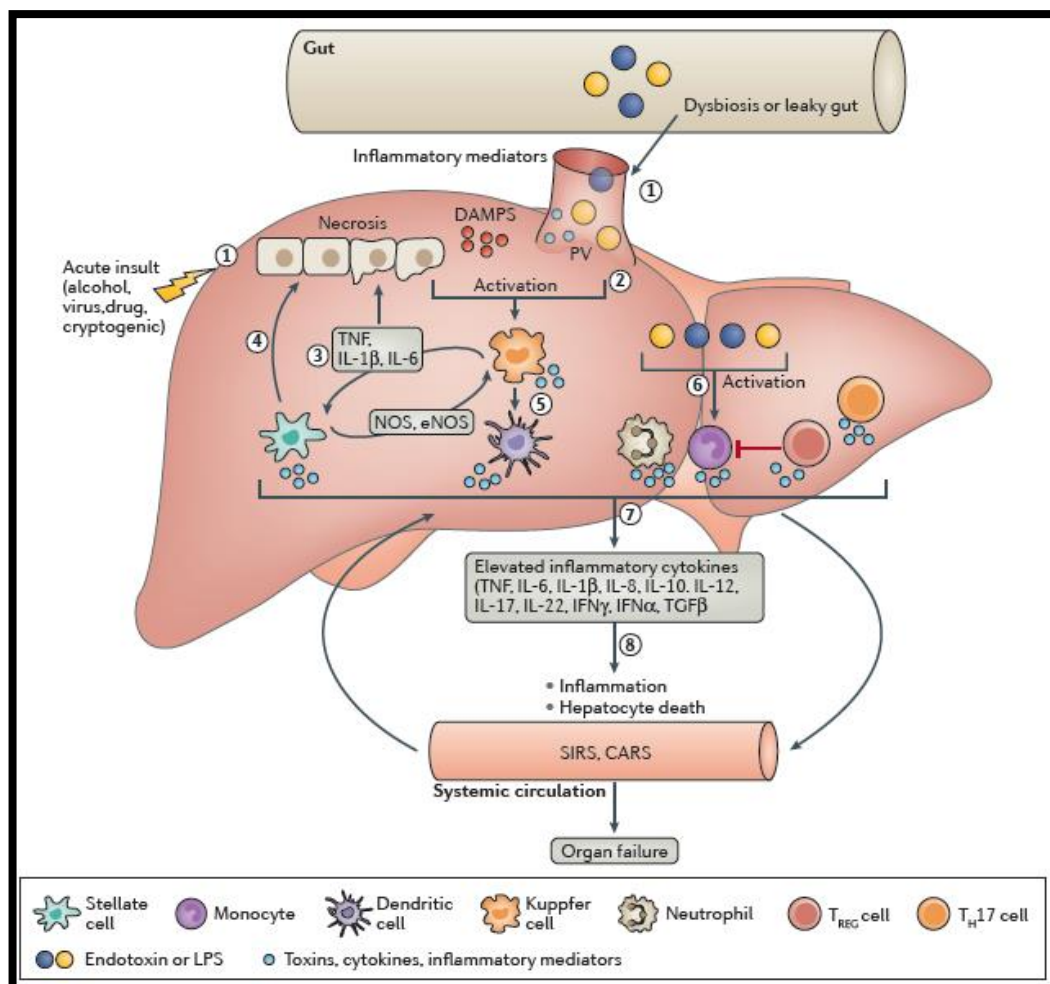


Figura 1: *El mecanismo de lesión del ACLF: Descompensación hepática aguda sobre la base de una enfermedad hepática crónica, acompañado de una respuesta inmune sistémica aumentada y alterada, asociado a fracaso de algún otro órgano o sistema. Tomado de: Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management (Sarin et al. 2016).*

A. 4. Complicaciones de la colestasis extrahepática

A. 4.A. Hipertensión portal:

El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático, vasculopatía, secundario a colestasis extrahepática produce HTP (Van Steenkiste et al. 2010; Hsu et al. 2014) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria de la enzima iNOS, de NO (Lee et al. 2010) y a un aumento de su metabolismo por incremento de especies reactivas de oxígeno (Esrefoglu et al. 2005). Las complicaciones clínicamente significativas de la HTP se producen cuando el gradiente de presión venosa hepática es superior a 10 mmHg (Miñano et al. 2011), destacando la HE, la ascitis, el síndrome hepatorenal y las varices gastroesofágicas (Rahimi et al. 2011; Abraldes et al. 2012).

Sin embargo, la alteración más representativa es la *circulación hiperdinámica* tanto esplácnica como sistémica. La *circulación hiperdinámica* se atribuye tanto al incremento de sustancias vasodilatadoras circulantes como a una reducida respuesta a sustancias vasoconstrictoras (Iwakiri et al. 2006; Laleman 2009) (Figura 2).

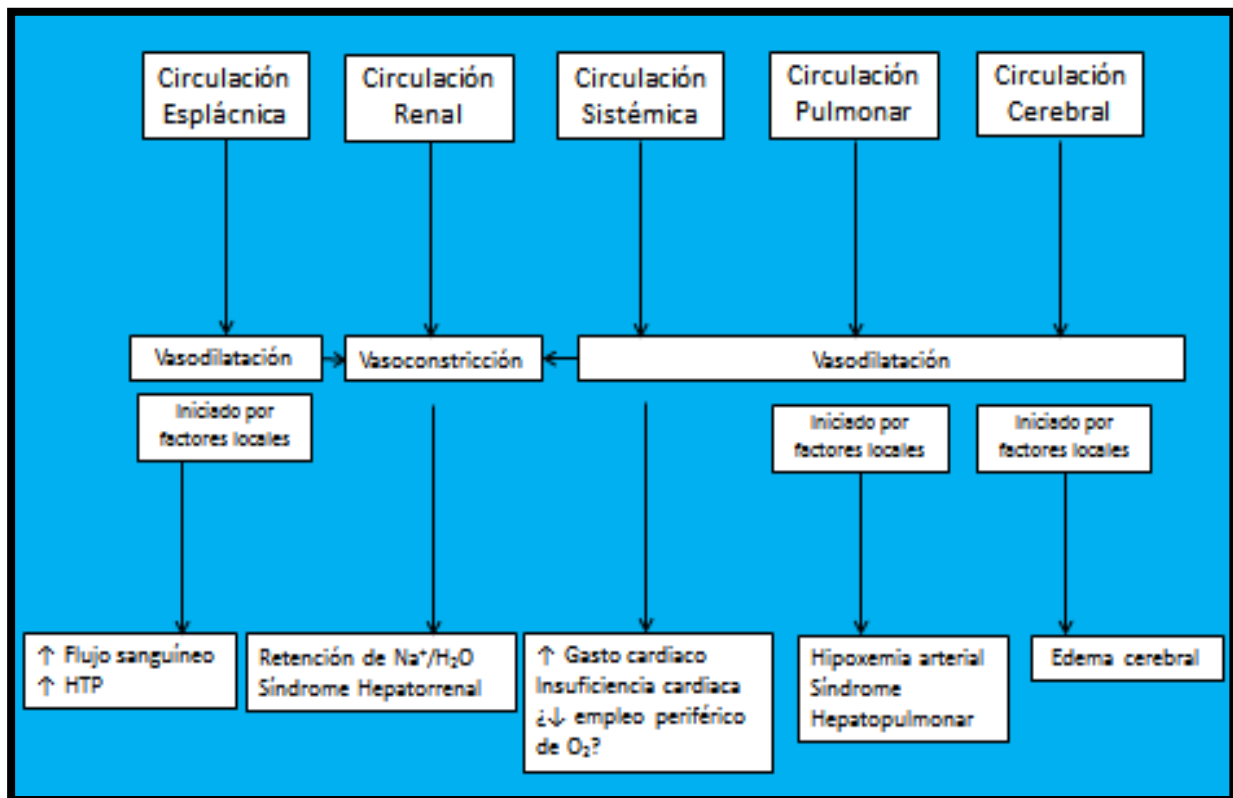


Figura 2: Tomado y adaptado de *The Hyperdynamic Circulation of Chronic Liver Diseases: From the Patient to the Molecule* (Iwakiri et al. 2006).

En esencia, las alteraciones hemodinámicas asociadas a la insuficiencia hepática crónica, la HTP, la translocación bacteriana, la HE o el síndrome hepatorrenal, sugieren la existencia de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica de origen multifactorial (Thabut et al. 2007; Aller et al. 2008; Tandon et al. 2008; Cazzaniga et al. 2009; Abdel-Khalek et al. 2011) así como una alteración en el tráfico de sustancias a distintos niveles, destacando el amonio (Wright et al. 2014; Romero-Gómez et al. 2015). Por ello, podría integrarse su estudio para la investigación de su tratamiento (Jalan et al. 2002; Coltart et al. 2013).

A. 4.B. Infecciones:

Una complicación frecuente de la colestasis extrahepática es la infección bacteriana con colangitis y posterior formación de abscesos. Charcot ya describió en 1877 la tríada clínica de fiebre, ictericia y dolor en el hipocondrio derecho que se asocia a la colangitis secundaria a litiasis o estenosis del colédoco (Lipsett et al. 1990; Lee 2009). La obstrucción del flujo biliar induce alteraciones sistémicas y modificaciones en la respuesta inmune local y sistémica del huésped. En pacientes cirróticos que sufren ACLF se ha observado una respuesta inflamatoria sistémica desproporcionadamente aumentada que puede desencadenar en fracaso multiorgánico (MOF) y fallecimiento del individuo. La activación de rutas celulares por componentes bacterianos, PAMPs, ocasiona una respuesta inflamatoria sistémica exagerada con producción incrementada de citoquinas proinflamatorias (Aller et al. 2013; Arroyo et al. 2015). Tales citoquinas actúan sobre el endotelio microvascular. Por un lado las citoquinas proinflamatorias activan a iNOS, que consecuentemente aumenta los niveles de NO sistémico, el cual deteriora la función inotrópica cardíaca, provoca vasodilatación arterial, disminuye el aporte sanguíneo a los tejidos y por consiguiente la oxigenación tisular. Pero también, se produce hipooxigenación tisular secundaria a la estimulación del endotelio microvascular y la formación de microtrombos (microinfartos tisulares) (Arroyo et al. 2015). La ausencia de bilis y de la secreción de inmunoglobulina A (IgA) en el tracto gastrointestinal, como consecuencia de la colestasis obstructiva, induce cambios en la flora bacteriana intestinal, pérdida de la integridad de la mucosa, aumento de permeabilidad de la membrana intestinal, disminución de la inactivación de endotoxina (lipopolisacárido), con sobrecrecimiento bacteriano, translocación bacteriana (Balzan et al. 2007; Alaish et al. 2013), bacteriemia portal, endotoxemia y

translocación de lipopolisacárido (LPS) al hígado, todo lo cual puede producir colangitis y sepsis (Sastre et al. 2012; Syal et al. 2012; Arroyo et al. 2015).

Las infecciones bacterianas más frecuentes son: la *peritonitis bacteriana espontánea* (PBE), causada por translocación bacteriana intestinal; las *infecciones urinarias* y la *neumonía*, que en el 80% son causadas por bacilos gram-negativos, en particular, por *Escherichia coli* de origen entérico (Bellot et al. 2013).

B/ VASCULOPATÍA: ARTERIOPATÍA EN LA INSUFICIENCIA HEPÁTICA

B. 1. Generalidades:

Las alteraciones que genera la colestasis extrahepática son diversas, presentándose a nivel local o hepático (fibrosis/cirrosis biliar), regional o esplácnico (HTP, circulación colateral portosistémica, translocación bacteriana intestinal, ascitis) y general o sistémico (encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal) (Jalan et al. 2002; Coltart et al. 2013). Hasta un tercio de los pacientes desarrollan afectación cerebral, encefalopatía hepática (Cauli et al. 2009b; Parekh et al. 2015), originada entre otras causas, por cambios en los parámetros fisiológicos de la circulación cerebral afectando, al metabolismo del amonio, al estrés oxidativo y a las vías de la inflamación (Felipo et al. 2002; Cauli et al. 2009b; Butterworth 2013; Vilstrup et al. 2014; Parekh et al. 2015).

Dada la importancia del órgano al que irriga y a sus pocas reservas nutritivas, la circulación cerebral está diseñada para asegurar un flujo sanguíneo adecuado y constante, constituyendo un 15% del gasto cardiaco. Por ello la anatomía vascular del cerebro es diferente comparada con la de otros órganos. En el ser humano, las carótidas internas proveen de sangre a la circulación cerebral anterior, mientras que

el sistema vertebro-basilar irriga el cerebro posterior. La aportación relativa de estos dos sistemas varía en función de las especies siendo en la rata el sistema vertebro-basilar el principal. Las arterias carótidas y la arteria basilar contribuyen a la formación del polígono de Willis (Figura 3), que permite establecer un flujo colateral en caso de oclusión de alguno de los sistemas o de sus ramas. Del polígono de Willis nacen tres grandes vasos (bilaterales, uno por cada hemisferio) que irrigan corteza cerebral, entre otras estructuras: arteria cerebral anterior (ACA), arteria cerebral media (ACM) y arteria cerebral posterior (ACP) (Lapiente et al. 2012; Cilliers et al. 2016; Javan et al. 2016; Liu et al. 2016).

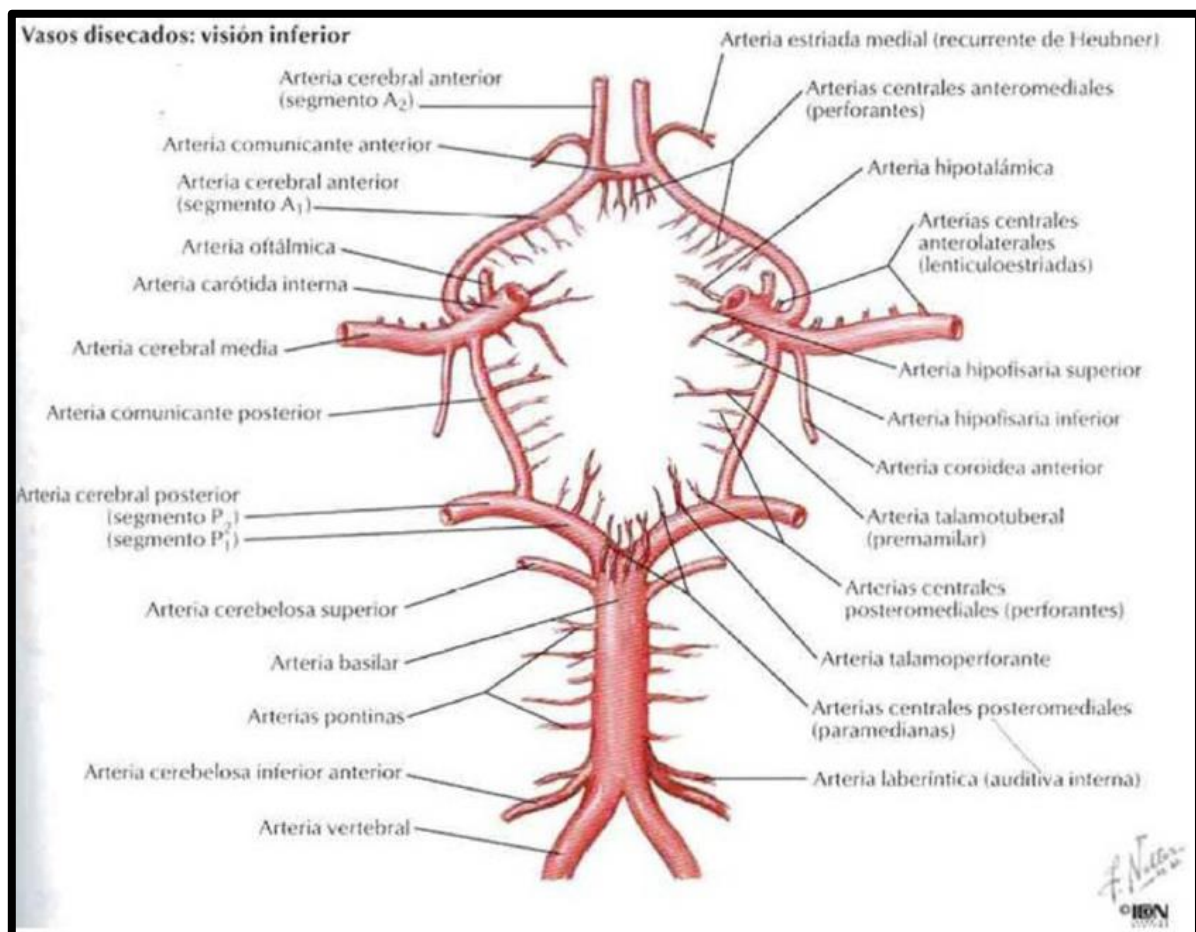


Figura 3: Polígono de Willis en cerebro humano. Tomado de: *Atlas de Anatomía Humana. Netter FH* 2012. 4ª ed (Caler et al. 2012).

Respecto a la resistencia vascular cerebral, la mayor parte es producida en los grandes vasos extra e intracraneales (Faraci et al. 1990; Peterson et al. 2011). Consecuentemente, éstos, a diferencia de los grandes vasos de otros circuitos, pueden redistribuir el flujo sanguíneo en función de las necesidades y amortiguar los efectos que los cambios de presión sistémica ejercen sobre los vasos intracraneales más pequeños (Faraci et al. 1990; Hou et al. 2000). Así, cuando la presión de perfusión cae se produce vasodilatación cerebral y cuando se eleva se produce vasoconstricción cerebral (Faraci et al. 1990; Faraci et al. 1998; Peterson et al. 2011; Di Marco et al. 2015b), manteniendo un flujo cerebral relativamente constante. En relación con la HE, se han publicado tanto incrementos como decrementos en la resistencia cerebrovascular, dependiendo de la severidad de esta patología (Hollingsworth et al. 2010; Macías-Rodríguez et al. 2015), conduciendo a descensos o aumentos en el flujo sanguíneo cerebral, respectivamente (Katz et al. 1998; Wright et al. 2007; Macías-Rodríguez et al. 2015; Sawhney et al. 2016).

Dentro de los factores reguladores del tono vascular, tanto neurales, metabólicos, como endoteliales, es importante mencionar:

- La innervación desde fibras sensoriales y autonómicas, tanto simpática, parasimpática, serotoninérgica, nitrérgica y peptidérgica (Hardebo et al. 1994).
- La presión parcial de O₂ y CO₂, así como los diferentes factores y hormonas procedentes del torrente sanguíneo (Parekh et al. 2015).
- Sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que en respuesta a estímulos mecánicos, cambios hemodinámicos, estímulos humorales o metabólicos, son liberadas por las células endoteliales (Cahill et al. 2001; Gatta et al. 2008; Peterson et al. 2011; Bolognesi et al. 2014).

B. 1.A. Estructura de la pared arterial:

La pared arterial está formada por tres capas concéntricas: túnica íntima (endotelio), túnica media y túnica adventicia (Figura 4):

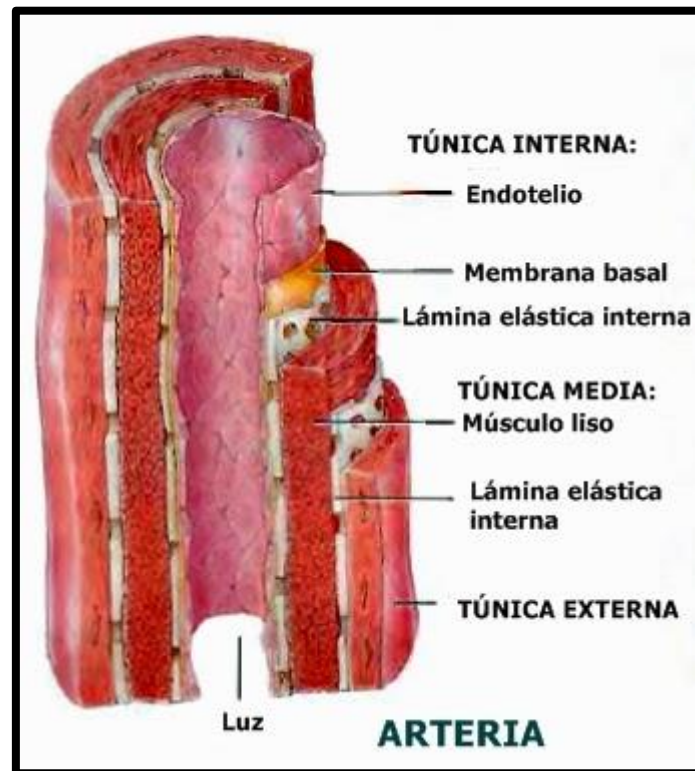


Figura 4: Estructura general de la pared arterial. Tomado de: <http://www.anatolandia.com/2014/09/estructura-y-funcion-de-los-vasos-sanguineos.html>

Túnica íntima: Capa de células endoteliales que reviste la superficie interna del vaso, constituyendo una barrera mecánica que también actúa como receptor y transmisor de señales (Lüscher et al. 2009; Boak 2004; Daugherty et al. 2004). Poseen acción exocrina, paracrina y autocrina frente a distintos estímulos respondiendo con diversas acciones, tales como la liberación de agentes vasoactivos (Lüscher et al. 1990; Li et al. 1992; Rubanyi et al. 2016), vasodilatadores

como NO, prostaciclina (PGI_2) o factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), vasoconstrictores como endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), tromboxano A_2 (TXA_2) o isoprostanos o especies reactivas de oxígeno como aniones superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Cahill et al. 2001; Andresen et al. 2006; Macías-Rodríguez et al. 2015).

El papel del endotelio en el trastorno circulatorio observado en la HTP y la cirrosis se concreta en una alteración en el equilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Cahill et al. 2001; Andresen et al. 2006; Bosch et al. 2015), describiéndose modificaciones en su liberación y/o alteraciones en su función que conducen a incrementos de la resistencia vascular en vena porta o a descensos del tono vascular en los lechos vasculares esplácnico y sistémico (Cahill et al. 2001; Didion et al. 2001; Vanhoutte 2009; Triggle et al. 2012). Concretamente, una de las alteraciones más representativas de dicha afectación hepática crónica es la existencia de circulación hiperdinámica tanto esplácnica como sistémica que se atribuye tanto al incremento de sustancias vasodilatadoras circulantes como a una reducida respuesta a sustancias vasoconstrictoras (Iwakiri et al. 2006; Laleman 2009; Aller et al. 2009b; Xavier et al. 2010; Bolognesi et al. 2014; Bosch et al. 2015; Hollenberg et al. 2016). De forma similar, el papel del endotelio en las arterias cerebrales puede modificarse en estados de *inflamación* como sucede en las condiciones de colestasis microquirúrgica que propone nuestro modelo, tema, este de las alteraciones cerebrovasculares en condiciones de cirrosis y encefalopatía hepática, poco estudiado (Tandon et al. 2008; Aller et al. 2010; Butterworth 2013; Romero-Gómez et al. 2015).

Túnica media: Compuesta por fibras musculares lisas orientadas circularmente, responsables del mantenimiento de la presión vascular, modulando el diámetro de la luz del vaso.

Túnica adventicia: Constituida por tejido conjuntivo con fibras elásticas y de colágeno tipo I, además de por una red laxa de fibras elásticas delgadas y terminaciones nerviosas que liberan distintos neurotransmisores (Li 1992; Boeckxstaens et al. 1997; Sastre et al. 2010; Sastre et al. 2016a; Sastre et al. 2016b).

B. 2. Mediadores del tono vascular:

B. 2.A. Óxido nítrico:

El NO es un mediador ubicuo que juega un papel central en múltiples sistemas del organismo modulando el flujo sanguíneo, procesos de proliferación (Tao et al. 2006) y diferenciación celular (Zuccolo et al. 2016). Se sintetiza en células gliales y endotelio en respuesta a diversos estímulos como noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), prostaglandinas o acidosis, etc. (Faraci et al. 1990; Palomero-Gallagher et al. 2013; Dhanda et al. 2015), y presenta actividad biológica local y rápida (Versari et al. 2009; Peterson et al. 2011; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016). Es resultado de la oxidación enzimática, mediante distintas *isoformas de la NOS*, de un N guanidino del aminoácido L-arginina, liberando como productos L-citrulina y NO. El NO generado provoca la activación de la guanilato ciclasa (Felipo et al. 2002; Lee et al. 2010) y/o de los canales de K⁺ (Faraci et al. 1998; Blanco-Rivero et al. 2011; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016), que son responsables de

la mayoría de los efectos fisiológicos del NO. Entre ellos está incluido el principal, el efecto vasodilatador producido por la relajación del músculo liso (Wiest et al. 2002; Xavier et al. 2014; Bosch et al. 2015; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016).

La NOS tiene tres isoformas distintas; las dos primeras son constitutivas de los tejidos que las poseen y la tercera es inducible ante estímulos externos. Las tres precisan los mismos cofactores para su activación, que son principalmente calmodulina, Fe hemo, flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄)

1.- *Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS II)*, enzima independiente de calcio (Triggle et al. 2012) y la que más cantidad de NO sintetiza (Wiest 2007). Se libera principalmente, en situaciones patológicas, por las células endoteliales (Peterson et al. 2011) y el músculo liso vascular (Morales-Ruiz et al. 1996), requiriendo síntesis *de novo*, estimulada por diversas citoquinas y endotoxinas. Por ello, el NO “*inducible*” es primordial en el desarrollo de shock séptico (Jalan et al. 2002; Andresen et al. 2006).

2.- *Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, NOS III)*, presente principalmente en las células endoteliales. El principal estímulo para su actividad es el Ca²⁺ pero también posee otros mecanismos como la fosforilación/defosforilación de aminoácidos (aa) (Wiest 2007; Gambaryan et al. 2015), y es estimulable farmacológicamente con acetilcolina (ACh) y bradikinina (BK) (Bhimani et al. 2003; Triggle et al. 2012) o mecánicamente por fuerzas de cizallamiento (Wiest et al. 2002; Gatta et al. 2008; Risør et al. 2015).

3.- *Óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS, NOS I)*, es una enzima citosólica presente en el *sistema nervioso*, donde funciona como neurotransmisor (Iwakiri et al. 2006; El-Mili et al. 2008; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016), pero también presente en músculo liso vascular y cardiomiocitos. Se encuentra en dos formas, a saber, *nNOS* y *nNOS fosforilada* (Andresen et al. 2006; Sastre et al. 2011).

B. 2.B. Prostanoides; Prostaciclina:

Los prostanoides son derivados del ácido araquidónico (AA), sintetizados *de novo* en la mayoría de las células, cuando éstas se activan por acción de estrés mecánico o estímulos bioquímicos (citoquinas, factores de crecimiento, colágeno, ADP o *BK* y trombina). A nivel del sistema circulatorio controlan el tono vascular, gracias a su efecto vasomotor (Blanco-Rivero et al. 2005b; Xavier et al. 2009).

El AA es transformado al precursor prostaglandina (PG) G_2 , que se peroxida posteriormente a PGH_2 , mediado por las dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX) (Triggle et al. 2012; Wong et al. 2013): *COX-1*, sintetizada de forma *constitutiva* pero modificable por ciertos estímulos como por ejemplo la tensión de cizallamiento (Okahara et al. 1998; Ospina et al. 2003; Risør et al. 2015; Rubanyi et al. 2016), importante en funciones *fisiológicas* como la agregación plaquetaria y la homeostasis renal (Gambaryan et al. 2015; Risør et al. 2015); y *COX-2*, cuya expresión puede ser estimulada por estados de inflamación inducida y ante estímulos *patológicos* tales como mitógenos, promotores tumorales y agentes proinflamatorios como citoquinas o endotoxinas (Brian et al. 2001), siendo esta isoforma a la que se le atribuye la mayoría de *las funciones inflamatorias* de los

prostanoides (Wong et al. 2013; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016). También se expresa constitutivamente en neuronas glutamatérgicas y puede participar en el control del tono cerebrovascular (Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016). La PGH_2 a su vez es sustrato de distintas enzimas en función de la célula implicada (Figura 5) (Brian et al. 2001; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016); a destacar las enzimas *tromboxano (TX) sintasa* (macrófagos, plaquetas y músculo liso vascular) para generar TXA_2 y *prostaciclina I_2 (PGI_2) sintasa* (células endoteliales y del músculo liso vascular) que produce PGI_2 .

La PGI_2 regula el flujo sanguíneo, posee un efecto vasodilatador a bajas concentraciones y vasoconstrictor a elevadas (Blanco-Rivero et al. 2005b; Xavier et al. 2009; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016). Sus acciones principales son la relajación de las células musculares lisas, la inhibición de la agregación plaquetaria y la modulación de otros factores vasoactivos. Su vida media es corta, no se almacena en la célula y su degradación es no enzimática, al metabolito estable 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ (6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$) (Okahara et al. 1998; Blanco-Rivero et al. 2009). Los principales factores que estimulan la síntesis y liberación de PGI_2 son Ang II, ACh o BK, y productos liberados de las plaquetas como 5-HT, interleuquina 1 (IL-1) (Gatta et al. 2008; Peterson et al. 2011; Hollenberg et al. 2016; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016).

B. 2.C. Tromboxano A_2 :

El TXA_2 participa en la vasoconstricción dependiente de endotelio (Cheng 2002; Blanco-Rivero et al. 2009; Xavier et al. 2010). La liberación del TXA_2 puede ser estimulada por agentes vasoconstrictores (endotelina, 5-HT, NA, Ang II) (Versari

et al. 2009), así como por agentes vasodilatadores (ACh, nicotina, ionóforo A23187) y por acciones mecánicas sobre el mismo endotelio (Davis et al. 2011; Krishnamoorthy-Natarajan et al. 2016). En consecuencia, el TXA₂ podría mediar en las acciones vasculares de estos factores. También participa en situaciones fisiológicas y patológicas, como la disfunción endotelial debida al envejecimiento (Versari et al. 2009; Di Marco LY et al. 2015b), la regulación de la angiogénesis y el desarrollo de metástasis (Di Marco LY et al. 2015b).

B. 2.D. Endotelina-1:

La ET-1 es un factor vasoconstrictor derivado de endotelio, siendo la endotelina su proteína precursora, llevándose a cabo el último paso en su síntesis en la circulación sanguínea por la Enzima Convertidora de Endotelina (ECE). Se conocen tres isoformas diferentes, ET-1, ET-2 y ET-3, cuya diferencia radica en su secuencia de aa y en la potencia vasoconstrictora (Rubanyi et al. 1991; Peterson et al. 2011).

La ET-1 se sintetiza en condiciones basales, como respuesta a estimulación mecánica, química o humoral, regulándose positivamente por Ang II, catecolaminas, factores de crecimiento y negativamente por NO, PGI₂, ET-3 o PGE₂ (Faraci et al. 1998; Friedman 2008; Bosch et al. 2015; Di Marco E et al. 2015). La ET-1 tiene la capacidad de regular mecanismos a corto plazo, como el tono vascular y la secreción a su vez de otros factores vasoactivos como la Ang II. A largo plazo estimula la proliferación celular, lo que sugiere un posible papel en los procesos de

remodelado vascular, hipertrofia ventricular cardiaca y alteraciones glomerulares proliferativas renales (Versari et al. 2009; Triggle et al. 2012; Chuang et al. 2014).

La ET-1 provoca vasoconstricción mediante uno de sus receptores específicos, el receptor ET_A , que se localiza en las células del músculo liso vascular, estimulando la vasoconstricción a través de tres rutas metabólicas: 1) aumentando la fosforilación de la cadena ligera de la miosina incrementando el Ca^{2+} intracelular, 2) inhibiendo la fosfatasa de la cadena ligera de miosina y 3) aumentando la fosforilación de filamentos finos asociados a proteínas vía activación de c-Src, Janus tirosin kinasa y proteína tirosin kinasa, resultando en la activación de ERK ½ (Andresen et al. 2006; Versari et al. 2009). A largo plazo, la activación de este receptor provoca la mencionada proliferación celular (Rubanyi et al. 1991).

ET_B , es otro receptor específico de ET-1, se encuentra predominantemente en las células endoteliales y en menor medida en el músculo liso vascular. Su estimulación produce vasodilatación cuando las concentraciones de ET-1 son bajas, mediada por un incremento en la producción de NO y PGI_2 (Andresen et al. 2006; Peterson et al. 2011), aunque también puede estimular la vasoconstricción (Peterson et al. 2011).

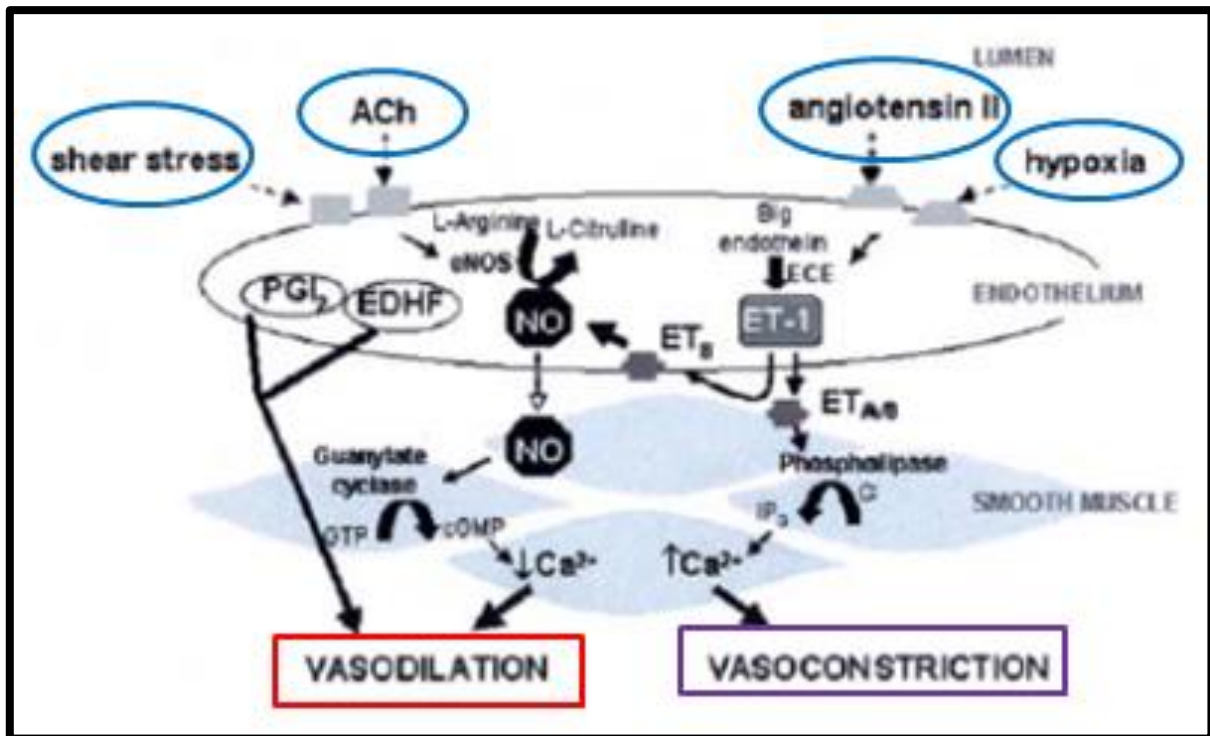


Figura 5: Adaptado de: *Hypercholesterolemia and Endothelium Dysfunction: Role of Dietary Supplementation as Vascular Protective Agents* (Boak 2004).

C/ ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

C. 1. Generalidades:

Constituye otra complicación de la insuficiencia hepática que ocasiona la colestasis hepática, que por la especial relevancia para nuestro estudio se expone en un apartado único. El término HE define un amplio espectro de estados patológicos donde la función cerebral se encuentra deteriorada como consecuencia de disfunción o fracaso de la función hepática (Cauli et al. 2009b; Leke et al. 2011; Felipo 2013; Wright et al. 2014).

C. 1.A. Formas de clasificación

A nivel organizativo y con el fin de elaborar un documento de consenso que permitiera estudiar y estructurar sus características para una mejor aproximación diagnóstico-terapéutica, en el decimoprimer Congreso Mundial de Gastroenterología, *11th World Congress of Gastroenterology*, celebrado en Viena en el año 1998, se estableció una nomenclatura para estandarizar sus subclases, categorizando tres tipos de encefalopatía A, B o C en función de características etiopatogénicas y clasificándola de acuerdo a ellas (Ferenci et al. 2002; Arias et al. 2006; Butterworth et al. 2009; Parekh et al. 2015); *Tipo A*, HE asociada a ALF; *Tipo B*, HE secundaria a derivación porto-sistémica sin ninguna enfermedad hepática asociada; *Tipo C*, HE que tiene lugar en pacientes con cirrosis e HTP o derivaciones porto-sistémicas (Arias et al. 2006; Butterworth et al. 2009; Parekh et al. 2015). Nuestro modelo experimental reproduce una entidad en proceso de caracterización que consiste en una descompensación hepática aguda que acontece entre la cuarta y la octava semana tras la colestasis extrahepática microquirúrgica (CM), sobre un lecho de disfunción hepática más larvado y crónico siendo denominada a nivel global como insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica (ACLF), catalogándose la afectación concreta del sistema nervioso central (SNC) y de sus funciones como encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica, la cual puede incluirse dentro de *Tipo C* de HE (Butterworth et al. 2009). Así mismo, *Los Criterios de West-Haven*, es otra clasificación para la HE que organiza los diferentes estadios en función del grado de severidad clínico, atendiendo al nivel de consciencia, a los hallazgos de la exploración física general y de la exploración neurológica en particular (Parekh et al. 2015): *0 Normal*, sin alteraciones a ningún nivel salvo mínimo deterioro psicomotor; *1 Alteración en el nivel de consciencia*, euforia o ansiedad, dificultades para el

cálculo simple y asterixis leve o temblor; 2 *Apatía o letargia*, desorientación leve en tiempo o espacio, cambios de personalidad, comportamiento inapropiado, asterixis franca y trastorno del discurso; 3 *Somnolencia y semi-estupor*, desorientación grave, confusión comportamiento extraño, clonus, rigidez muscular, hiperreflexia; 4 *Coma*, ausencia de respuesta al estímulo verbal o doloroso, descerebración.

Según la *Asociación para el Estudio de Enfermedades del Hígado* (APASL) el ACLF consiste en la agresión hepática aguda, manifestada como ictericia y coagulopatía, cuadro complicado dentro de las 4 semanas posteriores con ascitis o HE, en paciente con enfermedad hepática crónica previa. La *Asociación Europea para el Estudio del Hígado* (EASL) y la *Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado* (AASLD), lo describen como un deterioro de una enfermedad hepática crónica previa, en ocasiones relacionado con un desencadenante, y con una alta mortalidad por MOF durante los 3 siguientes meses (Wright et al. 2014).

Nuestro modelo experimental de CM en ratas Wistar reproduce el ACLF y consecuentemente la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica, formando parte del *Tipo C* de HE (Butterworth et al. 2009), puesto que sobre un deterioro crónico del sistema hepático, entre la cuarta y la sexta semana postoperatoria, tiene lugar una agudización y empeoramiento del individuo que finaliza con el *exitus* del animal a la octava semana de postoperatorio (Aller et al. 1993; García-Moreno et al. 2005; Arias et al. 2006; Aller et al. 2009a; Butterworth et al. 2009; Marques et al. 2012; Wright et al. 2014; Romero-Gómez et al. 2015).

C. 1.B. A nivel epidemiológico y de salud pública

La importancia de esta patología a nivel general y particular es grande. Pese a que la incidencia de ALF, que condiciona la HE Tipo A, es baja en regiones como EEUU o Europa, la tasa de HE entre los que lo padecen es alta (Felipo 2013). Además del ALF propiamente dicho, hay que incluir al principal grupo que desarrolla HE, HE Tipo C, en concreto la MHE que es la que padecen los pacientes con daño hepático crónico y síntomas más larvados, que afecta a un gran número de individuos (5,5 millones de personas sólo en EEUU) (Felipo 2013).

Por último y para centrarnos en la patología que vamos a desarrollar, es importante destacar que el ACLF es desencadenante de HE aguda-sobre-crónica (Tipo C de HE) en hasta el 34% de los pacientes, según algunas series (Romero-Gómez et al. 2015), con altas tasas de mortalidad, de hasta el 89% (Wright et al. 2014; Arroyo et al. 2015). El desarrollo de HE anuncia un mal pronóstico vital (Butterworth 2013).

C. 1.C. Clínica:

Es un complejo síndrome neuropsiquiátrico que sucede en hasta el 30% de los pacientes con colestasis hepática, y que provoca daño cognitivo, desorientación, desórdenes del comportamiento, cambios de personalidad, déficit de atención, somnolencia y alteraciones del ciclo sueño-vigilia, perturbaciones de la función motora como temblor, aleteo, bradicinesia, errores de coordinación, etcétera (García-Moreno et al. 2005; Cauli et al. 2009b; Leke et al. 2011; González-Usano et al. 2013; Palomero-Gallagher et al. 2013).

El grado de HE se extiende desde daño mínimo hasta coma y muerte, incluyendo otras alteraciones neurológicas, motoras y cognitivas intermedias tales

como cambios de personalidad, o las ya mencionadas, alteraciones del ciclo sueño-vigilia, alteraciones del movimiento y la coordinación motora, bradicinesia, entre otras (García-Moreno et al. 2005; Llansola et al. 2013). Estas alteraciones pueden ser expresadas de forma crónica y larvada por estos pacientes siendo ciertos desencadenantes los responsables de originar cuadros de HE franca aguda-sobre-crónica (Wright et al. 2014).

C. 1.D. Etiología. Fisiopatogenia. Consecuencias y alteraciones:

Las causas originarias de la HE, aguda, crónica o aguda-sobre-crónica son diferentes, así como lo son también sus consecuencias, evolución y grado de severidad (Cauli et al. 2009a; Romero-Gómez et al. 2015). En la patología crónica intervienen mecanismos adaptativos con el fin inicial de proteger al organismo, para los que no ha lugar en la aguda. Asimismo, cada tipo de alteración neurológica tiene un mecanismo de génesis diferente; seguir distintas rutas nos debe llevar a un estudio individualizado de cada alteración (Felipo 2013). Además hay que tener en cuenta que diferentes áreas neuronales regulan varias actividades pero que también cada función neurológica abarca la participación coordinada de distintas regiones cerebrales (Felipo 2013). Por todo ello, los mecanismos que provocan la HE no están bien caracterizados, pero en esencia se basan en el acúmulo de *neurotoxinas* que en condiciones fisiológicas el hígado sería capaz de eliminar (Parekh et al. 2015). Por consiguiente, la HE es consecuencia del fracaso hepático, resultando fundamental desenmascarar los elementos que la desencadenan, y en especial los de la HE aguda-sobre-crónica por la alta tasa de mortalidad que presenta (Wright et al. 2014; Arroyo et al. 2015). Para ello se han desarrollado modelos experimentales que tratan de reproducir los daños que padece el paciente humano en animales de

investigación, como se describe en próximos apartados (Aller et al. 1993; García-Moreno et al. 2005; Aller et al. 2009a; Assimakopoulos et al. 2009; Aller et al. 2012; Wright et al. 2012).

El estado del conocimiento actual respalda que los elementos con mayor implicación en el desarrollo y evolución de la HE son:

1.- *El metabolismo del amonio*, siendo la hiperamonemia uno de los principales factores causantes de la HE (figura 6) (Felipo et al. 2002; El-Mlili et al. 2008; Felipo 2013; Llansola et al. 2013; Wright et al. 2014). A nivel cerebral, la hiperamonemia ocasiona que el metabolismo del amonio en el astrocito genere un aumento de glutamina. La glutamina es un aminoácido que permite a la célula *detoxificar* el amonio pero a su vez es también un agente osmótico que ocasiona tumefacción de los astrocitos y consecuentemente alteraciones en la barrera hematoencefálica (BBB) porque la hace más susceptible a la endotoxemia a través de un mecanismo dependiente de COX (Wright et al. 2014).

2.- *Inflamación*: Otro elemento capital en la patogenia de la HE es la inflamación y sus vías de señalización (Jalan 2011; Butterworth 2013; Felipo 2013; Tivers et al. 2014; Wright et al. 2014; Arroyo et al. 2015). Un estado de inflamación sistémico es común en situaciones de fracaso hepático, considerándose un predictor de la severidad de la HE (Butterworth 2013). Brevemente, el fracaso hepático genera un estado basal de inflamación sistémica (Romero-Gómez et al. 2015) causado por la liberación de mediadores proinflamatorios secundario, entre otros, a los patrones moleculares asociados a daño DAMPS y/o a los patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs (Butterworth 2013; Moreau et al. 2013). El fracaso hepático también provoca que el amoniaco aumente en sangre y a su vez en el SNC, donde también se acumula láctico (Butterworth 2013). Esto ocasiona la activación de las

células de la microglía cerebrales, incrementándose los niveles de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y por consiguiente la neuroinflamación (Figura 6).

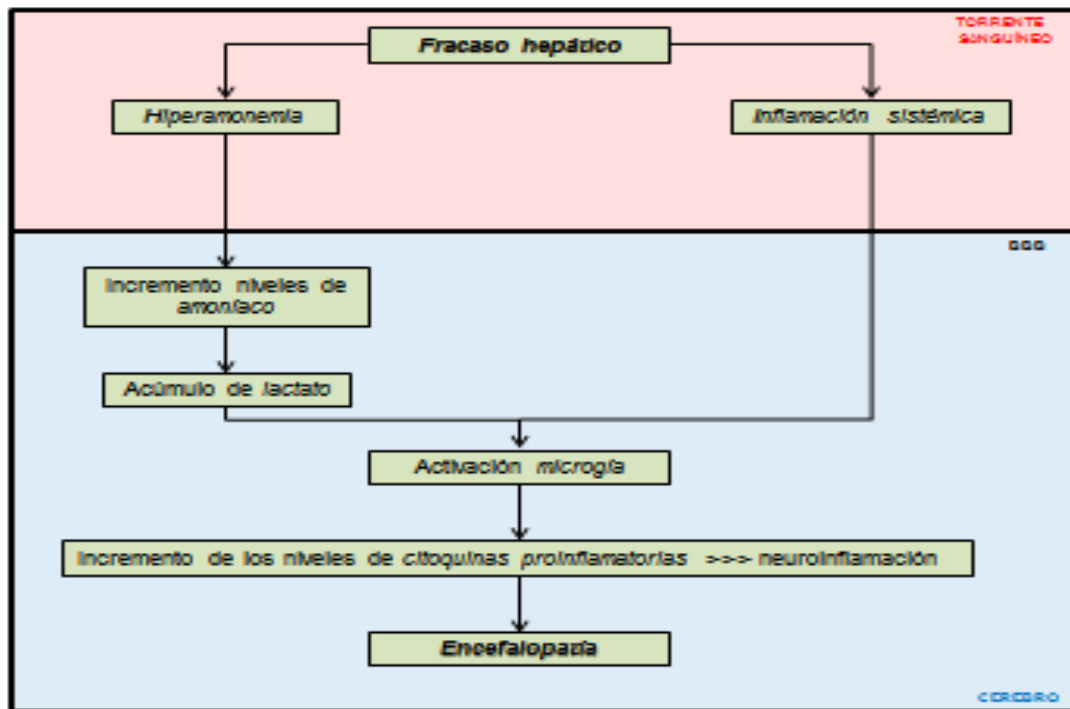


Figura 6: Interacción entre el hígado y el SNC, implicando la hiperamonemia, la respuesta inflamatoria sistémica y el acúmulo de lactato en el cerebro. Modificado de: *The liver-brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy* (Butterworth 2013).

La cascada de señalización entre hígado y cerebro está medida por diversos mecanismos. Los mediadores inflamatorios que se generan a nivel hepático, secundarios a la colestasis obstructiva como sucede en nuestro modelo experimental, o en otras ocasiones como producto de los desencadenantes de HE tales como sepsis, infecciones y polisacárido, hiponatremia, insuficiencia renal, hemorragia digestiva, deshidratación, etc., activan una serie de mecanismos locales hepáticos que explican el daño tisular a ese nivel, y que consecutivamente tienen repercusión sistémica y por tanto cerebral (Holt et al. 2009; Pellicoro et al. 2014). Los efectos de las moléculas proinflamatorias sistémicas, como el TNF, provocan la

activación de las células de la microglía, hecho que conlleva el reclutamiento de monocitos y la acumulación en el cerebro de mediadores como TNF, IL-1 β , IL-6 y el establecimiento de neuroinflamación. El acúmulo sustancias como amoníaco, lactato y manganeso en el cerebro y alteraciones en la BBB (Butterworth 2013) también participan en el estado de inflamación de estos pacientes, ya que la hiperamonemia per se induce neuroinflamación, demostrándose en ratas con daño hepático que padecen daño cognitivo y psicomotor, procesos que se revierten con *fármacos antiinflamatorios* (Felipo 2013).

3.- *El estrés oxidativo*, donde las especies reactivas de oxígeno que en cantidades fisiológicas regulan cascadas biológicas, en cantidades suprafisiológicas generan tal estrés oxidativo (Di Marco LY et al. 2015b). Existe una relación de sinergia que asocia los niveles crecientes de amonio con la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) mediado por los receptores NMDA y el amonio inducido por disfunción mitocondrial (Figura 7) (Wright et al. 2014).

4.- Los cambios hemodinámicos cerebrales secundarios a lo anterior (Wright et al. 2014) se relacionan con el estado de hiperamonemia y de inflamación, y provocan una disminución de flujo sanguíneo cerebral en la cirrosis, un incremento importante en ALF y un aumento de flujo moderado en el ACLF (Wright et al. 2014).

5.- En conclusión, en la patogenia de la HE existe una relación de sinergia entre la hiperamonemia y otras toxinas como el manganeso, el estrés oxidativo, el estrés nitrosativo, la inflamación sistémica y la neuroinflamación (Wright et al. 2014; Butterworth 2015).

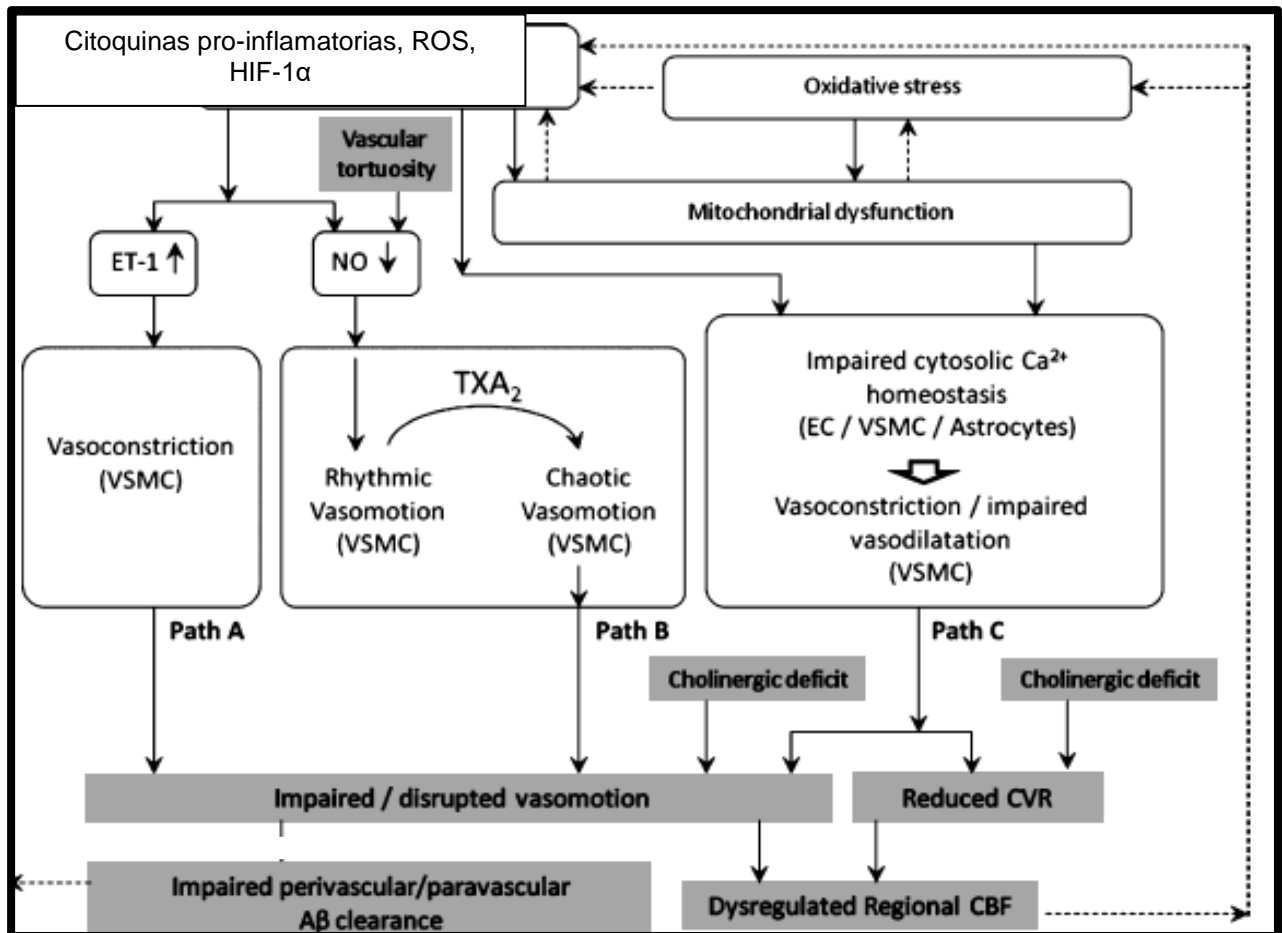


Figura 7: Adaptado de: *Is Vasomotion in Cerebral Arteries Impaired in Alzheimer's Disease?* (Di Marco LY et al. 2015a).

C. 2. Neurotransmisión

C. 2.A. Generalidades

La HE es un síndrome neuropsiquiátrico donde los eventos clínicos, ya explicados previamente, están relacionados estrechamente con alteraciones en la *neurotransmisión*, cuya causa etiopatogénica primaria es la insuficiencia hepática (Palomero-Gallagher et al. 2013; Wright et al. 2014). Las funciones neurológicas y procesos cerebrales alterados en la HE en ACLF son el resultado final de

disfunciones de la *neurotransmisión* en las redes de comunicación entre neuronas y con otras células (Cauli et al. 2009a; Cauli et al. 2009b; Romero-Gómez et al. 2015). Brevemente, el proceso de neurotransmisión tradicional implica diferentes pasos que conllevan la liberación del neurotransmisor desde la neurona pre-sináptica al espacio extracelular, la activación de receptores en la vertiente post-sináptica y consecutivamente de rutas bioquímicas que provocan la respuesta biológica. Pero esta cadena está modulada delicadamente bajo condiciones fisiológicas, que la HE originada por el fracaso hepático puede modificar a nivel de receptores, transportadores, rutas bioquímicas moleculares, alteraciones enzimáticas, etc., finalizando en la liberación de otros neurotransmisores distintos a los fisiológicos, activando terceras neuronas o activando desproporcionadamente el sistema inmune (Cauli et al. 2009b; Arroyo et al. 2015). Se han descrito alteraciones en la neurotransmisión en áreas concretas cerebrales que implican disfunciones en otro sistema neurotransmisor diferente, como por ejemplo sucede en la función motora (Jover et al. 2006; Cauli et al. 2014). Por ello, estos trastornos se deben considerar no solo consecuencia de disfunción de un neurotransmisor concreto sino como alteraciones generales de la neurotransmisión que implican a diferentes clases celulares. La hiperamonemia crónica que padecen estos pacientes contribuye a alterar la neurotransmisión en HE, comprometiendo diferentes sistemas neurotransmisores como el GABAérgico, el ciclo glutamina-glutamato, el dopaminérgico, el colinérgico o el serotoninérgico (Felipo 2013).

C. 3. Neurotransmisores implicados

Los aa son los principales neurotransmisores del sistema nervioso, destacando los implicados en el ciclo glutamina-glutamato y en el sistema del ácido gammaaminobutírico (GABA) (Palomero-Gallagher et al. 2013).

C. 3.A Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador, responsable de un tercio de la neurotransmisión sináptica excitadora (Felipo 2013; Cooper et al. 2016). Se sintetiza a partir de α -cetoglutarato, mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) mitocondrial (aminotransferasa), siendo a su vez convertido en glutamina empleando amoníaco y por consiguiente contribuyendo a la *detoxificación* del mismo (Parekh et al. 2015; Cooper et al. 2016). La glutamina es un agente osmótico que en condiciones de hiperamonemia se eleva de manera significativa provocando la tumefacción del astrocito y el consecuente edema cerebral (Walls et al. 2014), así como la síntesis de especies reactivas de oxígeno (Parekh et al. 2015).

La sinapsis glutamatérgica, brevemente se representa en el esquema inferior (Figura 8), donde el glutamato liberado a la hendidura sináptica es adquirido principalmente por el astrocito que *gracias* al amoníaco lo convierte en glutamina, que regresa a la sinapsis y a la neurona presináptica pasando a glutamato y liberando amoníaco (Bak et al. 2013; Parekh et al. 2015; Cooper et al. 2016).

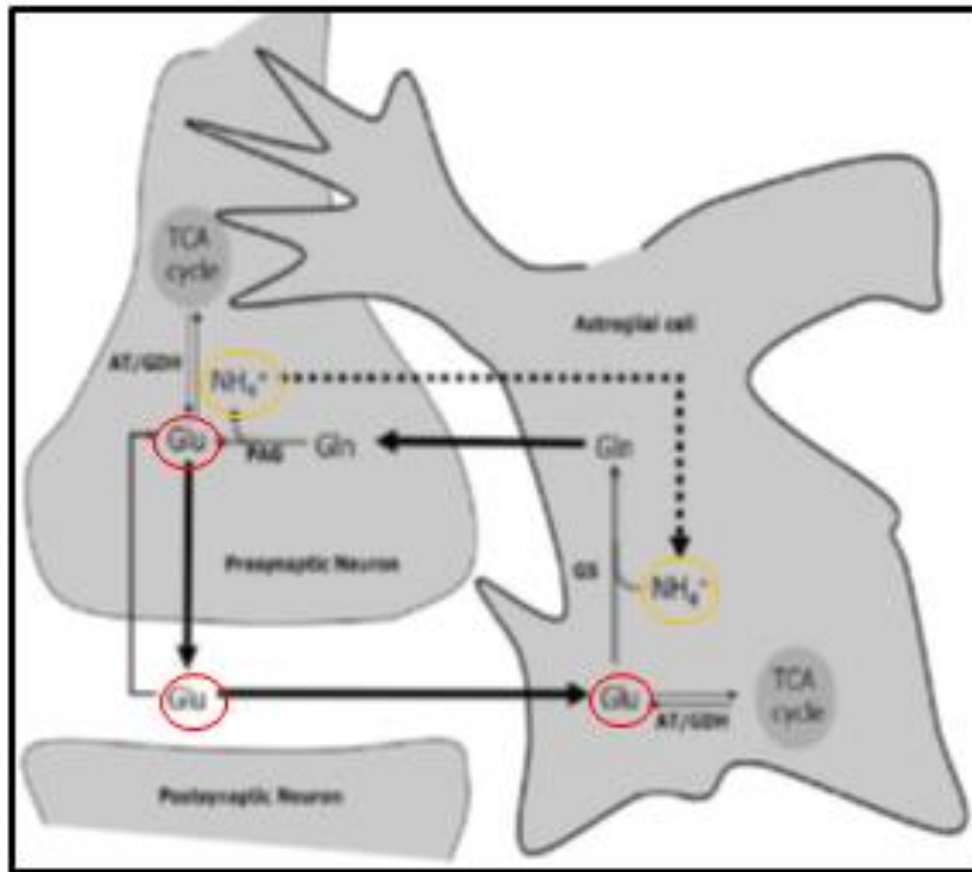


Figura 8: Sinapsis Glutamatergica. Tomado de: *Role of branched chain amino acids in cerebral ammonia homeostasis related to hepatic encephalopathy* (Bak et al. 2013)

En la HE, el glutamato funciona como *transportador de amonio* para entrar en la mitocondria en condiciones de hiperamonemia, como las presentes en nuestro modelo, y en la insuficiencia hepática (Leke et al. 2014a). La glutamina es sintetizada en el astrocito como producto de la unión de amonio y glutamato, y esta glutamina, un aminoácido inocuo, atraviesa la membrana mitocondrial de la neurona presináptica. Una vez en la mitocondria por una reacción de hidrólisis mediada por la enzima glutaminasa fosfato-activada genera amonio y glutamato. El aumento de amonio dentro de la mitocondria conlleva aumento en las especies reactivas de O_2 y N_2 desencadenando en estrés oxidativo y nitrosativo, disfunción mitocondrial y

alteración del poro de permeabilidad transicional de la membrana mitocondrial, causando tumefacción en la mitocondria y la muerte celular, mecanismo de daño celular bautizado como *teoría del caballo de Troya* (Leke et al. 2014a; Rama Rao et al. 2014; Parekh et al. 2015). Así mismo, la elevada potencia osmótica de la glutamina también participa en la tumefacción o *sweeling* de los astrocitos, favoreciendo el edema cerebral (Bak et al. 2013; Leke et al. 2014a; Leke et al. 2014b; Parekh et al. 2015).

Las alteraciones en el sistema glutamatérgico se relacionan con la HE, en especial con el receptor N-metil D-aspartato (NMDA) (Palomero-Gallagher et al. 2013), siendo el mecanismo responsable de la letalidad provocada por amonio (Palomero-Gallagher et al. 2013). El receptor NMDA es un receptor de membrana, generalmente para el glutamato (Figura 9). Es un receptor ionotrópico que permite el paso de Ca^{2+} , además de Na^{+} y K^{+} , lo que implica un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en la neurona postsináptica cuando el receptor se activa. Asimismo, el receptor NMDA es una proteína muy compleja y tremendamente regulada (por Mg^{2+} , Zn^{2+} , glicina entre otros). Su conductancia al Ca^{2+} es alta y siendo quizá ésta su peculiaridad más destacable y la responsable de muchas de sus funciones. Otra característica especial del receptor NMDA es que para la apertura del canal se necesita, además del glutamato, la presencia de un co-agonista, el aminoácido glicina. Estructuralmente está formado por varias subunidades, NMDAR1 y NMDAR2A-2D, y una función destacable es la de plasticidad sináptica, proceso que está en la base de los mecanismos de aprendizaje y en la formación de memorias como la episódica.

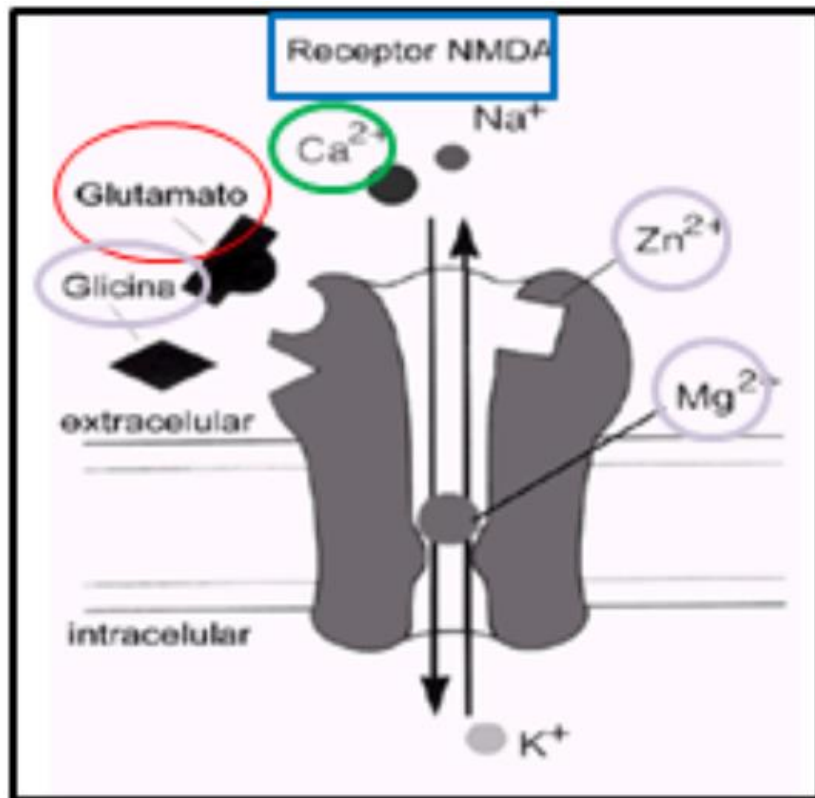


Figura 9: Representación gráfica de receptor NMDA

Por otra parte, desequilibrios a este nivel producidos por sobreactivación de este receptor, por ejemplo por liberación excesiva de glutamato, pueden conducir a patología como la epilepsia o a daños como muerte neuronal por sobreexcitación (Dávila et al. 2002).

C. 3.B. Ácido gammaaminobutírico

GABA, por el contrario, es el principal neurotransmisor inhibitor participando en hasta un 40% de las sinapsis de este tipo (González-Usano et al. 2013; Palomero-Gallagher et al. 2013).

Para la síntesis de GABA existe una vía clásica directa, partiendo del glutamato proveniente de glutamina. Una fracción de glutamato es descarboxilada

directamente a GABA, proceso catalizado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Figuras 10 y 12) (Leke et al. 2011; Bak et al. 2013; Leke et al. 2014b; Cooper et al. 2016), siendo sus subunidades principales GAD 65, localizada en las terminaciones nerviosas y GAD 67, localizada en el cuerpo neuronal (Leke et al. 2014b).

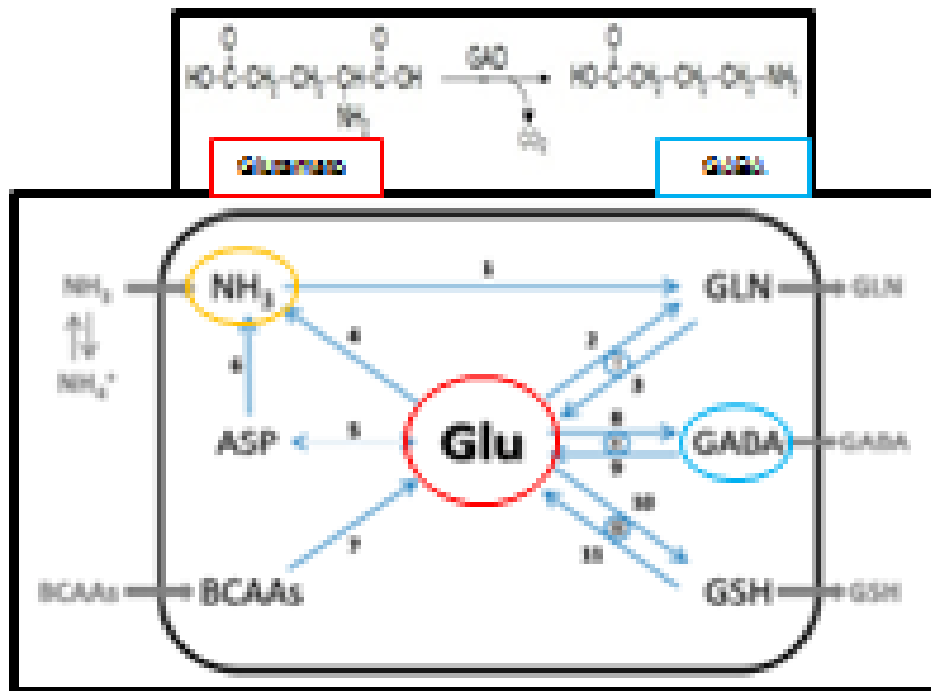


Figura 10: Papel central del glutamato en el metabolismo del amonio y sus interacciones con amonio, aspartato, aminoácidos de cadena ramificada, glutamina, GABA y glutatiol. Tomado de: *Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain* (Cooper et al. 2016).

Otra fracción sin embargo sufre transaminación, formando α -cetoglutarato (Leke et al. 2011). Esta segunda fracción en forma de α -cetoglutarato entra al Ciclo de Krebs (TCA), una ruta productora de energía, donde es utilizada finalmente para la síntesis de GABA, constituyendo una vía indirecta (Figuras 11 y 12) (Leke et al.

Introducción

2011). El aumento de amonio, como en nuestro modelo experimental y en la HE, es causante de un aumento de actividad del TCA (Leke et al. 2011).

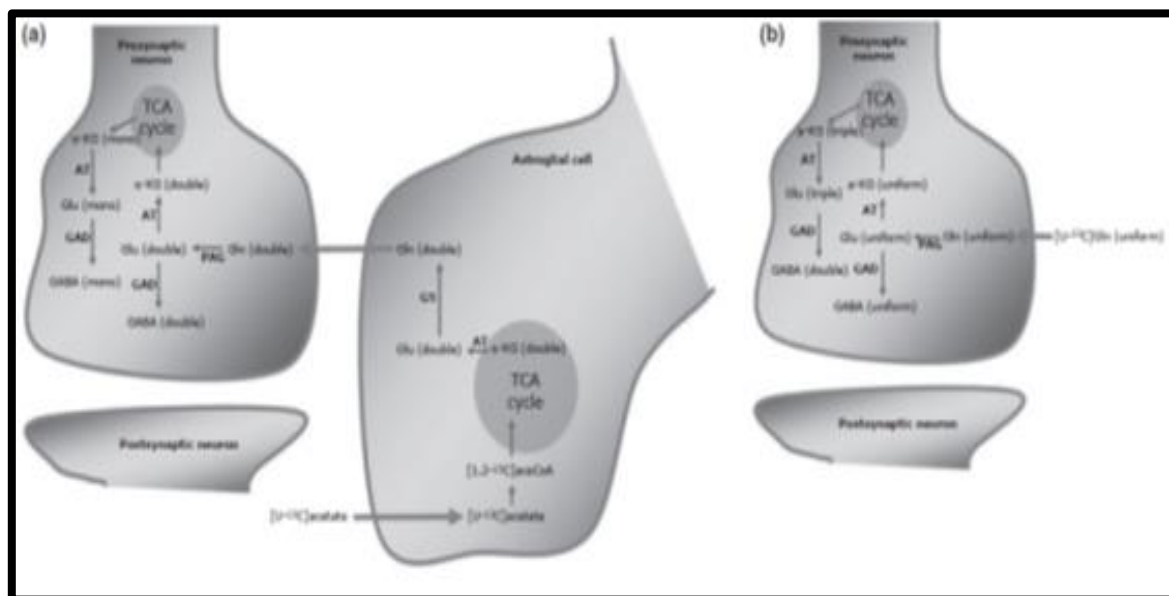


Figura 11: Representa la interrelación entre GABA y el TCA. Obtenido de: *Synthesis of neurotransmitter GABA via the neuronal tricarboxylic acid cycle is elevated in rats with liver cirrhosis consistent with a high GABAergic tone in chronic hepatic encephalopathy* (Leke et al. 2011).

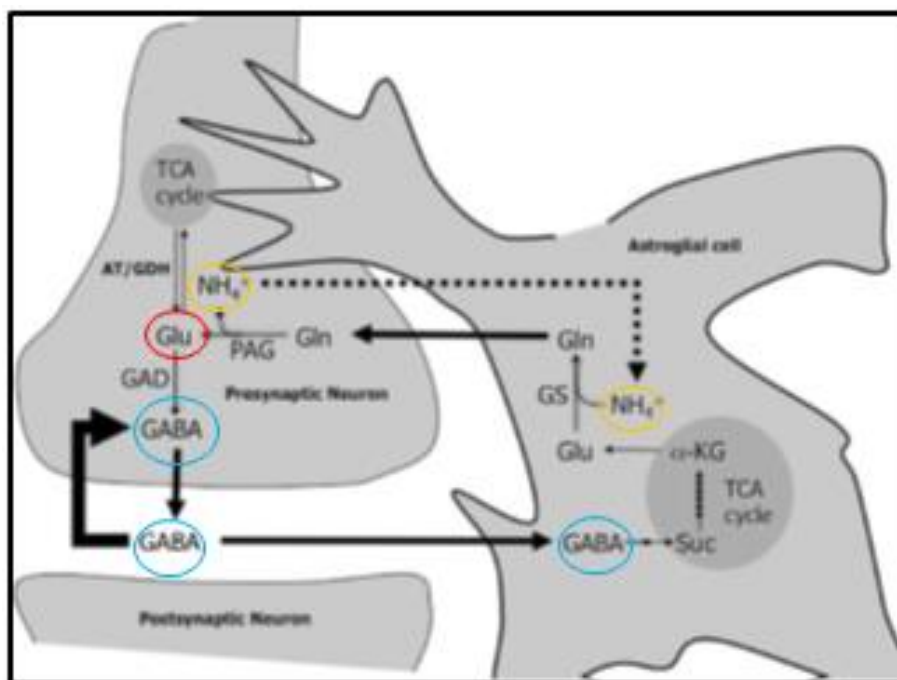


Figura 12: Sinapsis GABAérgica. Tomado de *Role of branched chain amino acids in cerebral ammonia homeostasis related to hepatic encephalopathy* (Bak et al. 2013).

Por ello, ha sido sugerido que la neurotransmisión GABAérgica está aumentada en situaciones de HE (Leke et al. 2011) y por consiguiente la función inhibitoria GABA, en relación con la hiperamonemia (Parekh et al. 2015).

C. 3.B. 1. Estructura de la sinapsis GABAérgica. Receptores implicados

GABA, como se comentó previamente, es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso (González-Usano et al. 2013) y su acción es regulada por sus receptores específicos. Se conocen dos receptores principales, a saber:

El receptor GABA_A, un receptor ionotrópico localizado en la membrana postsináptica cuyo mecanismo, brevemente, consiste en la hiperpolarización de la membrana al inducir la apertura de canales de Cl⁻, realizando su efecto inhibitor (van den Pol et al. 1998). La función de los receptores GABA_A es modulada por fosforilación, por lo que alteraciones en ello contribuirían a provocar cambios en el tono GABAérgico (Cauli et al. 2009a). Según refieren en su revisión de 2013 Palomero-Gallagher y Zilles, la regulación de los receptores GABA_A en HE es variable pudiendo ser al alza, indiferente o a la baja. Así mismo se expone la existencia de *neuroesteroides endógenos* capaces de unirse al receptor GABA_A, pudiendo ser responsables del aumento de tono GABAérgico asociado a la HE (Palomero-Gallagher et al. 2013; González-Usano et al. 2013), a través de la proteína translocadora de 18 kDa de la membrana mitocondrial (TPSO) (Figura 13) (Parekh et al. 2015).

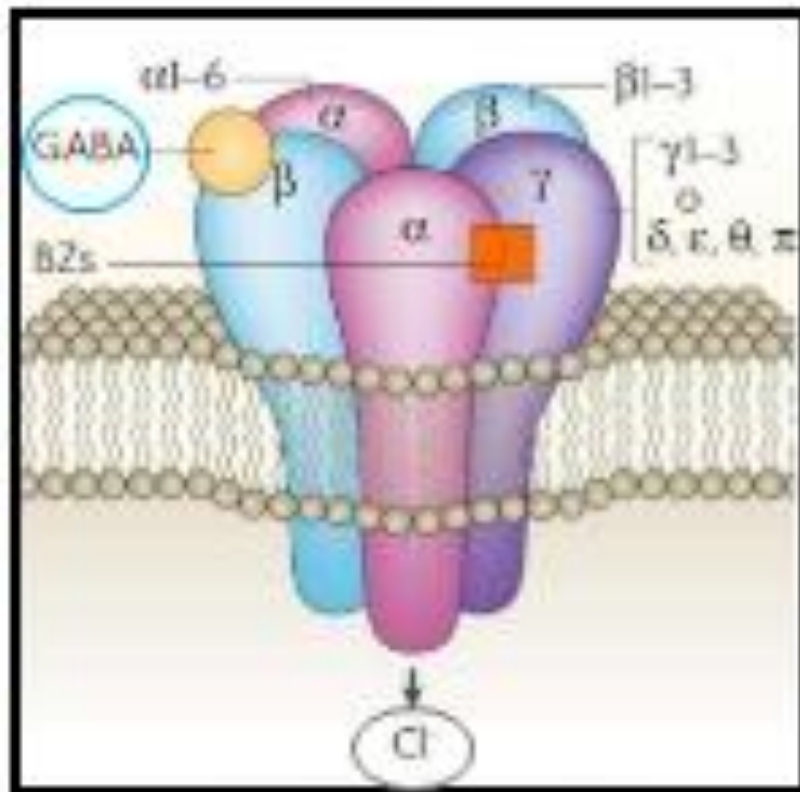


Figura 13: Esquema del receptor $GABA_A$, con sus diferentes subunidades. Tomado de: $GABA_A$ receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition (Jacob et al. 2008).

El receptor $GABA_B$ es un receptor que se expresa a nivel presináptico y postsináptico (van den Pol et al. 1998; Obrietan et al. 1999); A nivel presináptico, y como mecanismo regulador, su acción produce un descenso en la liberación presináptica de GABA por incremento de la conductancia presináptica a K^+ o descenso de la misma a Ca^{2+} , además de un *feedback* negativo para la regulación de la secreción sináptica de GABA (Figura 14) (van den Pol et al. 1998). Según refiere en su revisión de 2013 Palomero-Gallagher, el receptor $GABA_B$ es regulado a la baja en situaciones de hiperamonemia.

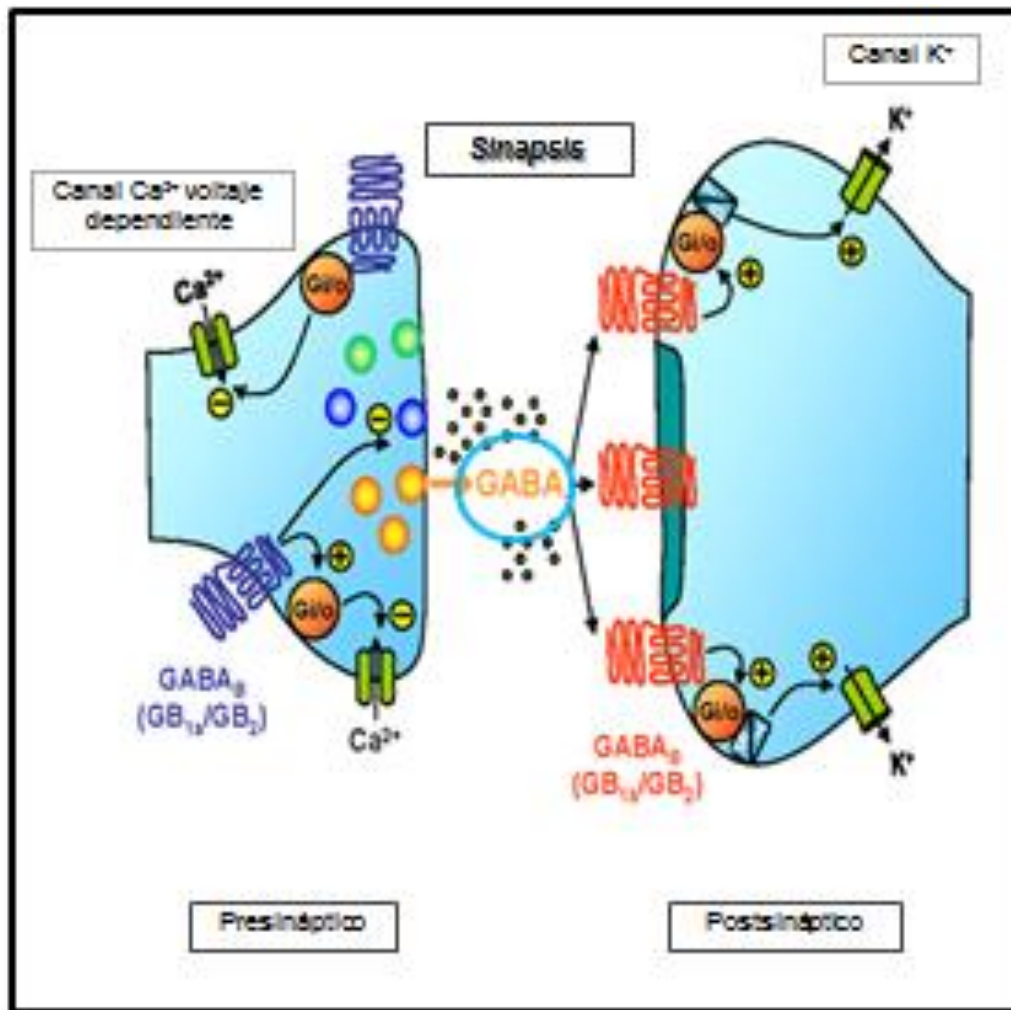


Figura 14: Representación de *receptores GABA_B* y sinapsis neuronal.

Se ha sugerido un aumento de tono GABAérgico en la HE, derivado del aumento de la liberación GABA, decremento de su consumo por los astrocitos e incremento de la estimulación de los *receptores GABA_A* por el propio neurotransmisor (Leke et al. 2011). En línea con esto, otros autores relacionan el aumento en el tono GABAérgico asociado a aumento de la síntesis intestinal de GABA y a una alteración de la permeabilidad de la BBB induciendo perturbaciones en los receptores GABA postsinápticos (Palomero-Gallagher et al. 2013).

C. 3.C. Otros neurotransmisores: dopamina, serotonina, adrenalina, noradrenalina.

Pese a que en nuestro estudio no se ha realizado determinación de tales neurotransmisores en los diferentes núcleos cerebrales, otros estudios publicados en la literatura realizados mediante ligadura del conducto biliar (BDL) sobre modelos experimentales en rata, sí los han determinado (Dhanda et al. 2015). Se observa un descenso en los niveles de DA y de 5-HT en corteza, hipocampo, estriado y cerebelo, y un aumento de A en la región cerebelosa, implicando también alteraciones del comportamiento y daño cognitivo, según estudios con laberinto en Y (Dhanda et al. 2015).

C. 4. Desequilibrio en aminoácidos plasmáticos.

La determinación de aa neurotransmisores en plasma se relaciona parcialmente con los niveles de los mismos en el SNC (Zavala De Ferrer et al. 2001), lo que nos lleva a su análisis.

C. 4.A. Características bioquímicas de los aminoácidos.

Los aa son los principales constituyentes de las proteínas, siendo estas últimas tres cuartas partes de la parte sólida del organismo (Guyton et al. 2003). Los aa son ácidos relativamente fuertes y en sangre se encuentran ionizados debido a la eliminación de un átomo de hidrógeno del NH_2 . Su concentración normal en sangre oscila entre 35 y 65 mg/dL (Guyton et al. 2003).

Con respecto a los niveles plasmáticos de aa, son de utilidad para el estudio de patología neurológica y psiquiátrica, principalmente por su gran accesibilidad para el análisis y porque es posible establecer correlaciones entre la concentración

plasmática de aa y ciertos trastornos neurológicos o psiquiátricos (Altamura et al. 1995; Zavala De Ferrer et al. 2001). El cerebro es muy sensible a cambios en la concentración de aa plasmáticos; su captación por parte del cerebro depende de la concentración de los mismos en plasma y de la afinidad relativa de cada aa por su sistema de transporte a través de la BBB (Zavala De Ferrer et al. 2001). Además existen relaciones de competencia entre aa por los transportadores en la BBB, por lo que aumentos o descensos en la concentración plasmática de uno o varios aa puede alterar el equilibrio entre aa competidores y consecuentemente el nivel y función de los mismos como neurotransmisores específicos en el SNC (Zavala De Ferrer et al. 2001). Por todo ello, el cerebro es altamente sensible a las variaciones en la concentración de aa en plasma.

Es preciso mencionar algunos aspectos relevantes de los aminoácidos; existen dos grandes grupos, clasificados como *esenciales*, si el organismo precisa aporte exógeno para mantener niveles fisiológicos y los *no esenciales*, que el organismo es capaz de fabricar (Guyton et al. 2003). La síntesis de aa depende de la formación de los α -cetoácidos pertinentes (Guyton et al. 2003); por otro lado, los aa se clasifican en *familias*, en función del precursor común a partir del cual se biosintetizan, estableciéndose estrechas relaciones de dependencia y síntesis sucesiva. Los grupos son los siguientes: *α -cetoglutarato*, incluyendo glutamato, glutamina, prolina, arginina; *piruvato*, incluyendo alanina, valina (aa ramificado), leucina (aa ramificado); *fosfoglicerato*, incluyendo serina, glicina, cisteína; *fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato*, (*aa aromáticos*) incluyendo triptófano, fenilalanina, tirosina; *oxaloacetato*, incluyendo aspartato, asparagina, metionina, treonina, lisina, isoleucina (aa ramificado); *ribosa 5-fosfato*, que incluye histidina.

Introducción

La estructuración e implicación de estas *familias* es interesante en lo relativo a la relación de síntesis encadenada que tienen los aa, y los *feedbacks* que se puedan establecer.

A continuación se detallan características destacables de otros aminoácidos, no reflejados con anterioridad en la exposición: *taurina*, que está presente en tejidos excitables del cerebro o del corazón, atribuyéndosele propiedades antioxidantes, osmorreguladoras, neuroprotectoras, reguladoras del Ca^{2+} (Olive 2002) y con acciones tales como inhibición de la función de los canales de Ca^{2+} , inhibición de la función de receptores de aa, potenciación de la función del receptor GABA_A o potenciación del receptor de glicina (Leon et al. 2009); *L-serina*, que posee función neurotrófica en el SNC y se sintetiza a partir de otros aa neuroactivos como glicina, cisteína, taurina, o de moléculas como proteínas, lípidos de membrana o nucleótidos; *alanina*, es uno de los productos generados tras la reducción del piruvato ($\text{alanina} + \text{cetogutarato} \leftarrow \rightarrow \text{piruvato} + \text{glutamato}$) e integrante del TCA; *arginina*, un importante transportador de nitrógeno que participa en la detoxificación de los grupos amonio y que en el organismo es sintetizado fundamentalmente a nivel renal a partir de citrulina absorbida por el intestino y de un donante de nitrógeno, que puede ser otro aa como el aspártico.

D/ MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA

La colestasis extrahepática cursa con una elevada incidencia de morbilidad y mortalidad (Gossard 2013). Las graves alteraciones hepáticas, esplánicas y sistémicas que produce la ictericia obstructiva, justifica la creación de modelos experimentales que permitan el estudio de sus mecanismos patogénicos, con el objetivo de instaurar eficaces medidas profilácticas y terapéuticas (Aller et al. 2008; Díaz-Gómez et al. 2011).

Los dos modelos experimentales más utilizados en la actualidad para el estudio de la cirrosis/fibrosis biliar, insuficiencia hepática y HE son la ligadura y sección del colédoco y la administración de tetracloruro de carbono (CCl_4), pero el primero se considera mejor que el segundo porque se evita la toxicidad que comporta el CCl_4 para los investigadores y porque, además el tiempo requerido para la obtención de alteraciones hepáticas es mucho más corto cuando se secciona el colédoco (Marques et al. 2012). La colestasis obstructiva inducida por la ligadura y sección del colédoco se considera el modelo experimental más grave de colestasis porque induce la interrupción brusca y completa del drenaje biliar (Pollheimer et al. 2014). En ésta situación acontece la inhibición predominante del receptor nuclear Farnoside X (FXR), un sensor nuclear hepatocelular de las sales biliares implicado en la síntesis de bilis por los hepatocitos, como consecuencia de la elevada concentración intracelular de sales biliares. FXR, a su vez inhibe la expresión de un polipéptido cotransportador de taurocolato sódico (NTCP), expresado en la membrana basocelular de los hepatocitos y responsable de la captación de sales biliares por los hepatocitos en contra de un gradiente de concentración. Estos

hallazgos se han interpretado como una respuesta adaptativa del hígado para reducir el efecto citotóxico de las sales biliares sobre los hepatocitos sometidos a estrés (Pollheimer et al. 2014). Por ello, el modelo experimental más frecuentemente utilizado de ictericia obstructiva es el resultante de la ligadura y sección del colédoco en la rata, que también se ha desarrollado en conejos y ratones (Akimoto et al. 2005; Abrales et al. 2006; Geerts et al. 2008; Liedtke et al. 2013). Además de la BDL, se han utilizado otros métodos como modelo experimental de colestasis neonatal, como la inyección intrabiliar de esclerosantes y *superglue*[®] en ratones, hámsteres, ratas y *minipigs*, que permiten estudiar las consecuencias metabólicas de la colestasis en ésta etapa de la vida (Petersen et al. 2013).

En la rata, animal de elección al no poseer vesícula biliar, la técnica quirúrgica de ligadura y sección del colédoco es sencilla ya que, al ser una técnica macroquirúrgica, no requiere medios de magnificación para su realización. En esencia, y tras laparotomía media o subcostal derecha, se disecciona el colédoco y se resecta entre dos ligaduras. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica pueden desarrollar un pseudoquistes biliar hilar por dilatación del colédoco proximal ligado residual, pudiendo infectarse por microorganismos Gram-negativos, desencadenando el fallecimiento de los animales durante las dos primeras semanas de evolución postoperatoria por sepsis secundaria a la existencia de múltiples abscesos intraperitoneales, hepáticos y pulmonares (Aller et al. 1993; Aller et al. 2004; Aller et al. 2009b; Llamas et al. 2010).

Las especiales características anatómicas del hígado de la rata (Figura 15), multilobulado donde cada lóbulo posee su propia vascularización portal y arterial así como un drenaje biliar y venoso individualizado, permiten mediante la utilización del

microscopio operatorio realizar una nueva técnica de colestasis extrahepática, microquirúrgica.

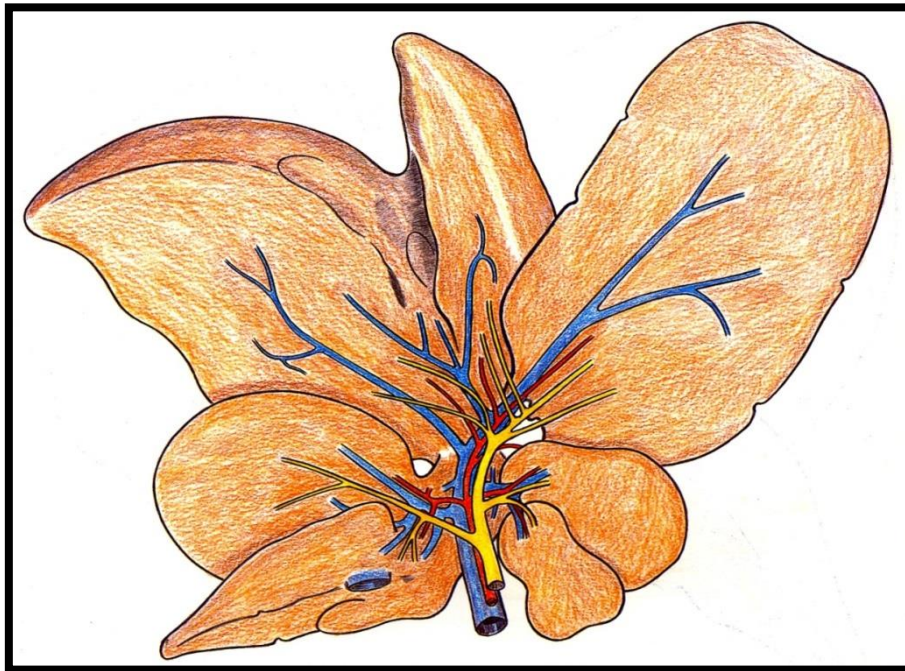


Figura 15: Anatomía hepática de la rata. Obtenido de: *Microsurgery In Liver Research* (Aller et al. 2009b).

La *técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática* (CM) en la rata permite la resección de la vía biliar extrahepática, que incluye el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática en continuidad con los conductos biliares, los cuales drenan de cada uno de los lóbulos hepáticos (Figuras 15 y 16) (Aller et al. 1993; Aller et al. 2009b; Aller et al. 2010; Aller et al. 2012). Con ésta técnica microquirúrgica, la inexistencia de vía biliar extrahepática residual previene la formación de pseudoquistes biliares hiliares, de abscesos abdomino-torácicos y reduce la mortalidad respecto al modelo clásico de ligadura y sección del colédoco (Aller et al. 1993; Aller et al. 2004; Aller et al. 2009b; Aller et al. 2010).

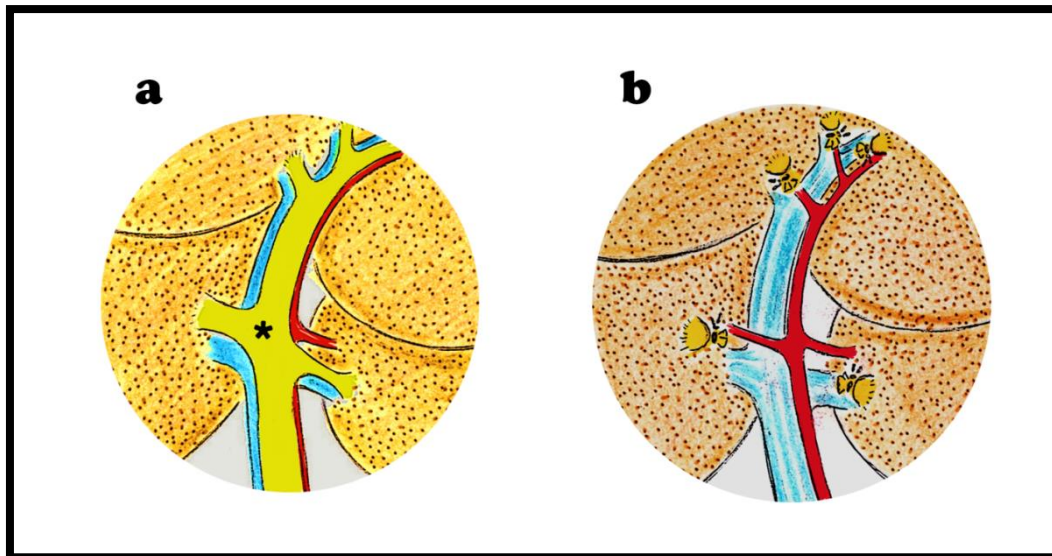


Figura 16: Técnica de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata. En el dibujo de la izquierda se representa la vía biliar extrahepática del hígado de la rata (a). En el dibujo de la derecha (b), tras la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática, se observan los conductos lobulares hepáticos ligados a ras del parénquima hepático. Tomado de: *Microsurgery In Liver Research* (Aller et al. 2009b).

Este modelo de CM, al conseguir mayor supervivencia, también permite obtener a más largo plazo un nuevo modelo de colestasis obstructiva, fibrosis hepática, insuficiencia hepática, HE, y por ende puede ser de gran utilidad para el estudio de la patogenia de tales enfermedades.

A este respecto, se debe considerar que durante la evolución de la colestasis extrahepática en la rata existen dos fases. La *fase evolutiva precoz* que se extiende hasta la cuarta semana del periodo postoperatorio, y la *fase evolutiva tardía* que comprende las posteriores semanas de supervivencia (Assimakopoulos et al. 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda, la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático y no existe aún hipertensión portal ni cirrosis, si bien se producen efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos cardíacos, hipotensión

arterial y vasodilatación periférica (Hajrasouliha et al. 2004; Moezi et al. 2013) y se altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Jacob et al. 1993; Moezi et al. 2013). Además, el acúmulo de ácidos biliares causa una intensa diuresis y natriuresis que pueden incluso producir una grave hipovolemia (Kramer 1997). Como consecuencia, se produce hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal (Kaler et al. 2004) que es agravada por la *endotoxemia* que acompaña a éste modelo experimental (Ábrahám et al. 2007).

A su vez, durante la fase evolutiva considerada crónica, esto es, superior a las cuatro semanas de postoperatorio, no solo existe colemia, sino que también presentan endotoxemia y translocación bacteriana intestinal (Clements et al. 1998; Ara et al. 2006), fibrosis/cirrosis biliar, HTP, ascitis (Abralles et al. 2006; Georgiev et al. 2008; Aller et al. 2009b; Han et al. 2014; Yang et al. 2014) que se asocia con una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorrenal de los enfermos cirróticos, y también HE y *daño cognitivo conductual* (García-Moreno et al. 2005). Los modelos de colestasis extrahepática, tanto macroquirúrgicos por ligadura del colédoco, como microquirúrgicos por resección de la vía biliar extrahepática, cursan a largo plazo, entre la 4ª y la 6ª semana del postoperatorio, con hepatomegalia, fibrosis biliar, infiltración leucocitaria de los espacios portales hepáticos y muerte de los hepatocitos por necrosis y apoptosis, aunque, no se observa la pérdida de la estructura normal hepática (Kountouras et al. 1984).

Para la puesta a punto de la técnica microquirúrgica de la colestasis extrahepática en la rata, se ha estudiado previamente la anatomía de la vía biliar extrahepática, se han descrito sus variantes anatómicas, se ha analizado la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller et al. 1993), y se ha estandarizado una *microtécnica* de fácil aprendizaje y mínima mortalidad atribuible a su ejecución.

El estudio del modelo experimental se ha fundamentado en la valoración de la patología hepatobiliar, del grado de fibrosis, de la proliferación biliar de los hígados de colestasis (Aller et al. 2004a; Aller et al. 2004b) y de las alteraciones bioquímicas plasmáticas propias de la lesión hepatobiliar, así como, en el análisis de las alteraciones del metabolismo oxidativo hepato-intestinal y cerebral (García-Moreno et al. 2002), de las alteraciones comportamentales del individuo (García-Moreno et al. 2005) y, por último, de la respuesta inflamatoria esplácnica mediante la determinación de las concentraciones de citoquinas pro y anti-inflamatorias en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon (García-Dominguez et al. 2010). La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (Ceftazidima, 50 mg/kg i.m.) y la administración semanal de vitamina K (Fitomenadiona, 8 mg/kg i.m.) reduce la mortalidad precoz de las ratas con colestasis extrahepática (Beck et al. 1995; Akimoto et al. 2005; Abalde et al. 2006). En particular, en las ratas con CM la supervivencia es superior a las ocho semanas y, por tanto, los resultados pueden ser más fácilmente extrapolados a la clínica humana, que se suele caracterizar por la evolución crónica de la colestasis extrahepática.

Por lo tanto las alteraciones en la fase precoz, en la fase tardía o a largo plazo de este modelo experimental, validan su empleo para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la colestasis extrahepática confirmando que es apropiado para el estudio de las complicaciones hepáticas y extrahepáticas derivadas de la colestasis obstructiva, por ende de la insuficiencia hepática y la HE. Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no solo es un modelo apropiado para el estudio de la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino que también reproduce las alteraciones esplácnicas y sistémicas propias de la ictericia obstructiva crónica, atresia biliar, en la clínica humana (Aller et al. 2008). En esta línea, la *Sociedad*

Internacional de Encefalopatía Hepática y Metabolismo del Nitrógeno recomienda la CM como modelo experimental adecuado para el estudio de la HE inducida por colestasis hepática (García-Moreno et al. 2002; García-Moreno et al. 2005; Assimakopoulos et al. 2009).

También se ha descrito un modelo experimental quirúrgico de ictericia obstructiva parcial, que consiste en la sección entre ligaduras de los conductos biliares de los lóbulos hepáticos medio, lateral derecho y caudado, dejando intacto el correspondiente al lóbulo lateral izquierdo, que no sufre por tanto obstrucción biliar (Polimeno et al. 2010). La colestasis selectiva lobular permite la supervivencia a largo plazo de los animales, aunque no evita que los lóbulos hepáticos colestásicos sufran proliferación biliar, discreta proliferación hepatocitaria e infiltración por células inflamatorias. Sin embargo, un hallazgo inesperado en éste modelo de colestasis selectiva ha sido la existencia de *proliferación biliar en el lóbulo lateral izquierdo, que no sufría colestasis obstructiva*. Este inopinado resultado también ha sido demostrado por otros autores cuando se ligan selectivamente sólo los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo (Tannuri et al. 2012). La conclusión es que la ligadura selectiva biliar induce alteraciones, evidenciadas por el aumento de expresión de actina de músculo liso alfa (α -SMA), una proteína relacionada con la fibrogénesis hepática, tanto en el parénquima hepático colestásico, como en el adyacente no sometido a obstrucción biliar. Estas alteraciones generalizadas hepáticas serían mediadas por vía paracrina y/o endocrina (Polimeno et al. 2010; Tannuri et al. 2012).

Además otros modelos experimentales no quirúrgicos, se han propuesto como alternativas válidas. En particular, los modelos de atresia biliar de etiología vírica en ratones, mediante la inoculación intraperitoneal de varios serotipos de

reovirus o rotavirus de monos Rhesus, que causan acumulo de células *natural killer* (células NK) y de células presentadoras de antígeno alrededor de los conductos biliares y una respuesta mediada por células T, con inflamación del hígado y de los conductos biliares e ictericia (Leonhardt et al. 2010). Pero una diferencia fundamental, es que estos ratones fallecen antes de desarrollar una fibrosis biliar grave (Petersen et al. 2013).

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

La encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica es una entidad nosológica actualmente no bien caracterizada. La colestasis extrahepática microquirúrgica experimental es un modelo que permitiría el estudio de dicho tipo de encefalopatía hepática. Entre los factores etiopatogénicos de la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica destacan la vasculopatía arterial sistémica y por extensión la arteriopatía cerebral así como las concentraciones anómalas de aminoácidos en el sistema nervioso central, factores que influenciarían o generarían las alteraciones metabólicas que se describen en este tipo de encefalopatía. Con este estudio se pretende conocer la implicación de elementos vasculares cerebrales alterados y su posible repercusión a nivel de aminoácidos/neurotransmisores, que permita establecer una mejor caracterización de esta patología.

OBJETIVOS

A/ OBJETIVOS PRINCIPALES:

A. 1. *En un modelo de encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica secundaria a colestasis se estudian los factores etiopatogénicos implicados en la producción de la arteriopatía cerebral.*

A. 2. *En dicho modelo experimental se analizan las alteraciones del metabolismo cerebral de los aminoácidos que podrían ser esenciales en la producción de tal encefalopatía.*

B/ OBJETIVOS SECUNDARIOS

B. 1. Estudio, en arterias cerebrales, de las posibles alteraciones producidas sobre los factores vasoactivos.

B. 2. Análisis de la repercusión sobre la arteria cerebral media, que tales alteraciones de factores vasoactivos pudieran generar.

B. 3. Estudio, en distintas áreas cerebrales y en plasma, de las concentraciones de aminoácidos glucogénicos que influenciarían la evolución de la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica.

Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL

1. A. ANIMALES

Se emplearon 18 ratas macho de la cepa Wistar, cuyo peso corporal osciló entre 200 y 400 gramos, procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), en Madrid. Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*.

1. B. INSTALACIONES

1. B.1. Animalario

La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, número de registro EX-021U. Dicho animalario, es un Centro de Asistencia a la Investigación establecido de acuerdo con las directrices de la Unión Europea, del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España, y de la Comunidad Autónoma de Madrid, cumpliendo con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal presentes en 2010/63/UE y RD 53/2013. El Animalario cuenta con instalaciones óptimas homologadas para la cría, mantenimiento y cuarentena de animales de experimentación, así como con instalaciones propias para la investigación, quirófanos y laboratorios anexos para la manipulación, toma de muestras y alojamiento de roedores durante el postoperatorio.

Material y Métodos

1. B.2 Sala de operaciones

La técnica quirúrgica, en la que se fundamenta el modelo experimental utilizado, se realizó en la Unidad de Microcirugía en el Área de Cirugía Experimental del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en una sala que disponía de (Figura 17):

- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.
- Mesa de trabajo de 80 x 100 cm.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC.
- Balanza de precisión Precisa® ISO 9001, para pesar a los animales.
- Contenedor desechable de residuos biológicos cortantes y punzantes.
- Vaporizador de flujo continuo para anestesia inhalatoria, de usos exclusivo veterinario
- Fuente de O₂: bombona: 10,6 m³ de O₂ a 200 Kg/cm²
- Arcón congelador a -80 °C.
- Lámpara
- Manta eléctrica

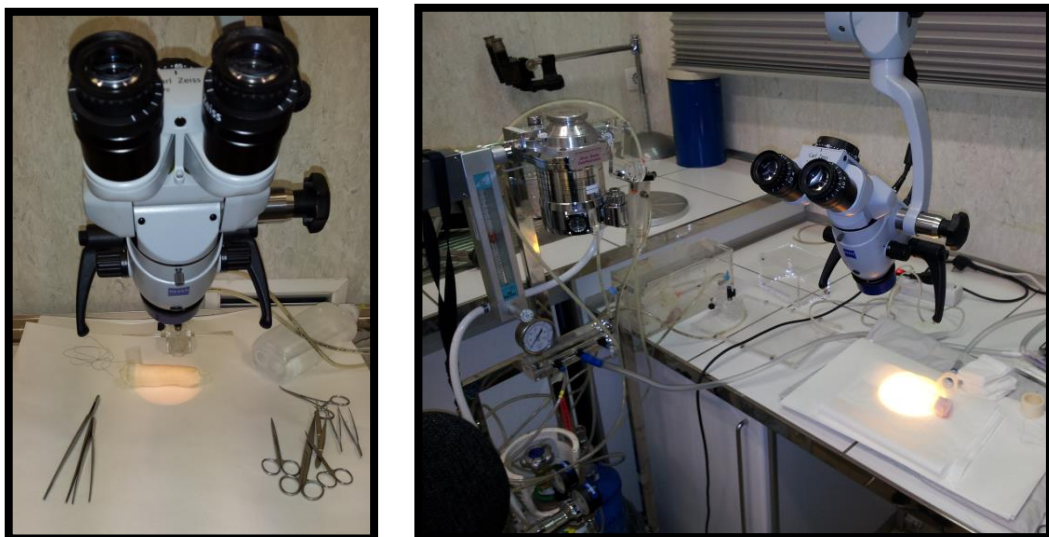


Figura 17: Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC y puesto de trabajo

1. B.3 Sala de evolución postoperatoria

El Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid posee instalaciones propias acondicionadas para el mantenimiento y el control de la evolución postoperatoria de las ratas intervenidas.

1. B.4 Sala de sacrificio y procesado de muestras

Esta sala dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos punzantes.
- Centrífuga.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.

1. B.5 Área de conservación de muestras

Se habilitó un espacio acondicionado para este fin, tanto en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, así como en el Departamento de Psicobiología de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) sita en Madrid.

Ambas disponen de arcón congelador que permite conservar muestras a -80°C o a -70°C según requerimientos. El traslado de las mismas se desarrolló en condiciones adecuadas para el mismo empleando neveras portátiles sin romper la cadena de frío.

1. B.6 Eliminación de residuos biológicos

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial destinada para tal fin que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (Electrolux Home Products España, S.A. Madrid).

1. B.7 Laboratorio de fisiología vascular

La actividad experimental desarrollada en la parte del trabajo relacionada con el estudio vascular y la determinación de sustancias vasoactivas fue efectuada en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UAM. Se trata de un laboratorio dotado de los equipos y reactivos necesarios para llevar a cabo la experimentación propuesta.

1. B.8 Laboratorio de Neurobiología y Neuroquímica

La actividad experimental desarrollada en la parte del trabajo relacionada con la determinación de aminoácidos en plasma y núcleos cerebrales fue efectuada en las instalaciones del Laboratorio de Neurobiología y Neuroquímica de la UNED, ubicado en el campus de Ciudad Universitaria en Madrid. Se trata de un laboratorio dotado de los equipos y reactivos necesarios para llevar a cabo la experimentación propuesta.

1. C. FÁRMACOS

1. C.1 Anestésicos

Se empleó anestesia inhalada:

- Isoflurano (Forane[®], Abbott laboratories S.A. Avda. de Burgos, 91, 28050 Madrid) a una concentración de inducción de entre 3-5%, y de mantenimiento de 1,5-2%.

1. C.2 Otros fármacos

- Ceftazidima pentahidrato 1g (Fortam[®] 1g Lab. GlaxoSmithKline S.A., Tres Cantos, Madrid).
- Fitomenadiona, vitamina K₁ ampollas 10 mg/ 1 ml, (Konakion[®] Roche Farma S.A. C/ Eucalipto nº33, 28016, Madrid).
- Buprenorfina 0,05 mg/ kg/ 12 horas.

1. D. INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO

1. D.1.Caja de instrumental de microcirugía inventariable, que incluye:

1. D.1. A Pinzas (número de unidades)

- Pinza de microcirugía recta sin dientes de 10,5 cm. (Allgaier instrumente[®], Germany) (1).
- Pinza de microcirugía curva sin dientes de 10,5 cm. (Allgaier instrumente[®], Germany) (3).

- Pinza de disección sin dientes de 13 cm. (Allgaier instrumente©, Germany) (2).
- Pinza de disección con dientes de 13 cm. (Tekno©, Germany) (1).
- Mosquito curvo sin dientes de 10 cm. (Allgaier instrumente©, Germany) (1).

1. D.1. B Porta-agujas

- Mayo-Hegar de 13 cm. (Mediq©, Germany) (1).
- Mayo-Hegar de 15 cm. (Orla©, Germany) (1).

1. D.1. C Tijeras

- Tijera de microcirugía curva de 10 cm. (Mediq©, Germany) (2).
- Tijera de Metzenbaum recta de 14 cm (Dimeda©, Germany) (1).
- Tijera de Mayo recta de 14 cm. (Dolf, Germany) (1).

1. D.2. Material de sutura y ligadura

- Seda negra trenzada ligadura 6/0 Silkam® (B. Braun España).
- Sutura de VICRYL® (poliglactina 910) aguja curva 3/0 (Ethicon Inc.).
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 3/0 Silkam® (B.Braun España).

1. D.3 Material quirúrgico complementario

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo, talla 7 (King™ Amebil S.A. Vizcaya. España).
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles), talla 7 (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK).

- Gasas de 10 × 10 cm. (Envase de 10 unidades Texpol[®]. Manresa. España).
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del Bages, S.A. Barcelona. España).

1. D.4 Otros materiales para el procedimiento quirúrgico y la extracción de muestras

- Guantes de protección frente a mordedura de animales.
- Cilindro de gasa de 10 × 2 × 3 cm.
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml. BD Discardit[™] II (Becton Dickinson SA. Fraga. Huesca. España).
- Agujas de tipo Luer 20G 0,91 × 25,4 mm. (monoject magellan Safety Needle, Tyco Healthcare Group LP. USA).
- Agujas de tipo Luer 21G 0,82 × 38,1 mm. (monoject magellan Safety Needle, Tyco Healthcare Group LP. USA).
- Agujas de tipo Luer 25G 0,51 × 15,8 mm. (monoject magellan Safety Needle, Tyco Healthcare Group LP. USA).
- Hoja de bisturí de acero estéril de nº 11 (Albion Surgical Limited. Sheffield, England).
- Suero Fisiológico Vitulia 0,9%; ClNa, 0.9 g/ 100 ml. Envase 500 ml.
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1,8 litros (Sanipick Plastic SA. Madrid).
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos.
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España).

- Guantes de protección frente frío Midera 10.
- Lámpara.
- Manta térmica.

1. D.5 Equipo de laboratorio

- Centrífuga (PowerSpin™, modelo MX 8624).
- Balanza analítica de precisión (Precisa® ISO 9001).
- Miógrafo de alambres (Multi Wire Myograph System - 620M, Danish Myo Technology A/S®, Åarhus, Denmark).
- Pipetas de precisión (Gilson™).
- Lector colorimétrico de placas (MTX Labsystems, Finlandia).
- Tubos Eppendorf®.
- Lector de placas Multiskan Ascent, Labsystems®, empleando el programa Ascent Software®.
- Sistema de electroforesis Mini-PROTEAN TETRA CELL (Bio-Rad®).
- Fuente de alimentación PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad®).
- Aparato de transferencia vertical (Mini Trans-Blot, BioRad®).
- Programa informático Scion Image for Windows® (2000 Scion Corporation®).
- Equipo de electroforesis capilar PA 800: Electrophoresis System Beckman®, junto con un láser de 488 nm Argon-ion laser (Beckman-Fullerton CA, USA).
El capilar de sílice fundido empleado fue de 75 µm de diámetro interno (Beckman Coulter®), 350 µm de diámetro externo, 60 cm de longitud (50 cm hasta el detector).

1. D.6 Reactivos: estudio vascular

- Solución Krebs-Henseleit (KHS): Composición en mM: NaCl 115; CaCl₂ 2,5; KCl 4,6; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 1,2; NaHCO₃ 25; glucosa 11,1; Na₂ EDTA 0,03 (reactivos Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Tampón de extracción compuesto por: 1 mmol/L de vanadato sódico, 1% SDS y 10 mmol/L pH 7,4 Tris-HCl (reactivos Sigma-Aldrich®).
- Tampón Laemmli (Laemmli 1970) que contiene 0,01 % azul de bromofenol; 0,100 mM ditiotreitól; 0,1% glicerol; 2% SDS y 0,060 M Tris-HCl pH 6,8 (reactivos Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Tampón de transferencia: Tris 0,025 M (pH 8,3), glicina 0,192 M y metanol 20% (v/v) SDS 1% (reactivos Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Tampón de electroforesis compuesto por; como tampón de transferencia Tris 25 mmol/L (pH 8,3), glicina 192 mmol/L (v/v) y SDS 10% (p/v) como detergente (reactivos Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Acrilamida (Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- TBS: 100 mmol/L pH 7,4 Tris-HCl, 0,9% p/v NaCl, 0,1% SDS (reactivos Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Tampón de bloqueo BSA al 5% p/v (Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- BK (Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Cloruro Potásico (KCl) (Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- ACh (Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad Immun-Blot®) de 0,2 µm de diámetro de poro
- Anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal anti-eNOS (1:1000, Transduction Laboratories[®], Lexington, UK).
- Anticuerpo policlonal anti-eNOS fosforilada en el residuo de Ser 1177 (1:1000; Abcam Laboratories[®])
- Anticuerpo monoclonal anti-nNOS (1:2500, Transduction Laboratories[®], Lexington, UK).
- Anticuerpo policlonal anti-nNOS fosforilada en el residuo de Ser 1417 (1:1000 dilution; Abcam Laboratories[®])
- Anticuerpo monoclonal anti-iNOS (1:1000, Transduction Laboratories[®], Lexington, UK).
- Anticuerpo policlonal anti-TXA₂ sintasa (1:500, Cayman Chemical[®], USA).
- Anticuerpo policlonal anti-PGI₂ sintasa (1:500, Cayman Chemical[®], USA).
- Anticuerpo policlonal anti-ECE-1 (1:500, Abcam Laboratories[®]).
- Anticuerpo secundario, correspondiente: anti-IgG de conejo o ratón, obtenido en cabra, conjugado con actividad peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech[®], Piscataway, NJ, diluido 1:1000).
- Kit de revelado, Amersham ECL[™] Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech[®], Piscataway, NJ)
- Sistema de obtención de imágenes ChemiDoc[™] MO System (Bio-Rad[®]).
- Anticuerpo monoclonal anti-β-actina conjugado con peroxidasa (1:50000, Sigma-Aldrich[®], España).
- Kit comercial *Nitric Oxide Assay Kit* (Colorimetric, Abcam[®] UK)
- Kit comercial *Thromboxane B₂ EIA Kit* (Cayman Chemical Company[®], U.S.A.)

- Kit comercial *6-keto Prostaglandin F_{1α} ELA Kit* (Cayman Chemical Company[®], U.S.A.)
- Kit comercial *Endothelin 1 ELISA Kit* (Abcam[®], U.K.)

1. D.7 Reactivos: estudio de neuroaminoácidos

1. D.7 A Tratamiento muestras de tejido cerebral

- Tampón de Homogeneización. Se fabrica de la siguiente manera:
 - HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid): 49,99 mmol/L.
 - Sacarosa (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid): 319,9 mmol/L.
 - Inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Roche[®]): 1 tableta para cada 50 ml.
 - Inhibidores de fosfatasas (PhosphoStop, Roche[®]): 1 tableta para cada 10 ml.

Se enrasa todo con agua MilliQ[®] 18,2 MΩ.cm.

- pH final: 7,8.

1. D.7 B Tratamiento de muestra de plasma

- Acetonitrilo (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid).
- Tampón borato (pH 10.2): 70mM SDS (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid), 5% metanol (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid), 17,5 mM HP-CD (Aldrich Chemistry[®]), 5mM DM-CD (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid).
- Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid).
- Estándar interno: D-Glutámico, concentración 8,7 mM (Sigma-Aldrich[®] Química SA, Madrid).

- L-Arginina (Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid).
- Patrones y reactivos químicos: Ácido L-Glutámico, D-Glutámico, L-Aspártico, GABA, D-Serina, L-Serina, L-Alanina, Taurina, L-Lisina, L-Arginina, Glicina, Tetraborato sódico, docedil-sulfato sódico (SDS), heptakis-2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina (DM-CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP-CD) y FITC. Todos ellos fueron empleados de grado analítico. Se obtuvieron de la casa Sigma-Aldrich® Química SA, Madrid.

2.- MÉTODOS

2. A. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplica el modelo de colestasis microquirúrgica extrahepática en rata Wistar. Para ello se dividen los individuos en dos grupos de intervención; un primer grupo control con individuos pseudooperados, donde se practicó laparotomía media y disección sin sección del colédoco. Un segundo grupo constituido por animales a los cuales se practicó colestasis extrahepática microquirúrgica.

Tabla 1: Diseño experimental de los grupos de ratas utilizadas en este trabajo

GRUPO 1. PS	n=8	Pseudo-operación
GRUPO 2. CM	n=10	Colestasis microquirúrgica extrahepática

Los animales fueron sacrificados a la octava semana de postoperatorio en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se determinaron diferentes parámetros físicos y alteraciones macroscópicas, descritas en el apartado

de actividad quirúrgica. Asimismo, se realizó posterior necropsia diseccionando y extirpando para su análisis y procesado hígado, cerebro, arterias cerebrales, así como, adquisición de muestras sanguíneas.

2. B. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

2. B.1 Condiciones de utilización, cría y estabulación de los animales

2. B.1 A Cría y estabulación

La estabulación de los animales durante el periodo de tiempo en el que se realizó la parte experimental del presente trabajo se practicó de acuerdo con la legislación vigente, en las instalaciones provistas a tal efecto en el Animalario de la Facultad de Medicina de la UAM.

Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C, y con una humedad relativa del 65-70%. Las condiciones de luz/oscuridad fueron cíclicas, estableciéndose periodos alternos de 12 horas (8:00-20:00h/20:00- 8:00h). Los animales se mantuvieron en grupos de 2, en cajas homologadas de policarbonato (Plexiglas de 42x65x15cm; Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona) (Figura 18). Dichas cajas fueron etiquetadas, consignándose en éstas últimas los datos de identificación de cada animal, y se colocaron en estanterías. Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar para roedores de laboratorio (dieta de mantenimiento A04. Panlab: España) y agua *ad libitum* (Aller et al. 2009).



Figura 18: Animales estabulados en cajas de *Plexiglas*.

2. B.2 Normativa para la cría, cuidado y empleo de animales de experimentación

La investigación se ajusta a los requisitos jurídicos de la legislación vigente. España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos, derogada y corregida por la Directiva de la Comisión Europea 2010/63/UE. Así mismo se ajusta a los requisitos de la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* publicada por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, revisada en 1996). La legislación relativa a este asunto se incorporó a nuestro ordenamiento legal el 4 de agosto de 1986 en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre *Protección de los Animales utilizados para experimentación y otros fines científicos* (BOE 252; 21-10-2005) (Aller et al. 2009). Derogado y corregido por el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la

docencia (B.O.E. nº 34, 8 de febrero de 2013, pág. 11370-11421). Corrección del RD53/2013 publicado en B.O.E. nº 100, 26 de abril de 2013.

2. C. TÉCNICA ANESTÉSICA

El principal objetivo de la anestesia cuando se utilizan animales de laboratorio es de carácter ético y consiste en evitar dolor y sufrimiento innecesarios. Independientemente del método anestésico elegido por cada grupo de investigación, éste debe conseguir suficiente relajación muscular para que la cirugía pueda ser realizada fácilmente, debe bloquear la actividad refleja para impedir la activación del Sistema Nervioso Autónomo y, por lo tanto alteraciones de la frecuencia y del ritmo cardíaco y, lo más importante, la técnica anestésica debe procurar un grado suficiente de pérdida de conciencia por hipnosis que, unido a la analgesia, impida que el animal sufra dolor. En definitiva, el objetivo fundamental de la anestesia es causar a los animales de experimentación el mínimo estrés físico y psicológico asociado a la cirugía experimental (Aller et al. 2009a).

Entre los múltiples métodos de anestesia descritos en la rata los fundamentales son los que utilizan la vía inhalatoria o la vía parenteral. En este estudio, la anestesia se administró por vía inhalatoria utilizando isofluorano, con una concentración de inducción al 3-5%, y de mantenimiento al 1,5-2%, administrada a través de un vaporizador de flujo continuo conectado a una bombona de O₂ (Figura 19). Esta pauta proporciona un plano anestésico quirúrgico y adecuada relajación muscular durante el tiempo que dura la intervención. Una vez finalizado el tiempo quirúrgico la recuperación espontánea de la conciencia se produce habitualmente durante los 5, 10 minutos posteriores. Por la sensibilidad de los pequeños roedores

a la hipotermia (Butterworth et al. 2009), durante la intervención y el postoperatorio inmediato se colocó a las ratas en un ambiente cálido suministrado por una manta eléctrica (Aller et al. 2009a).

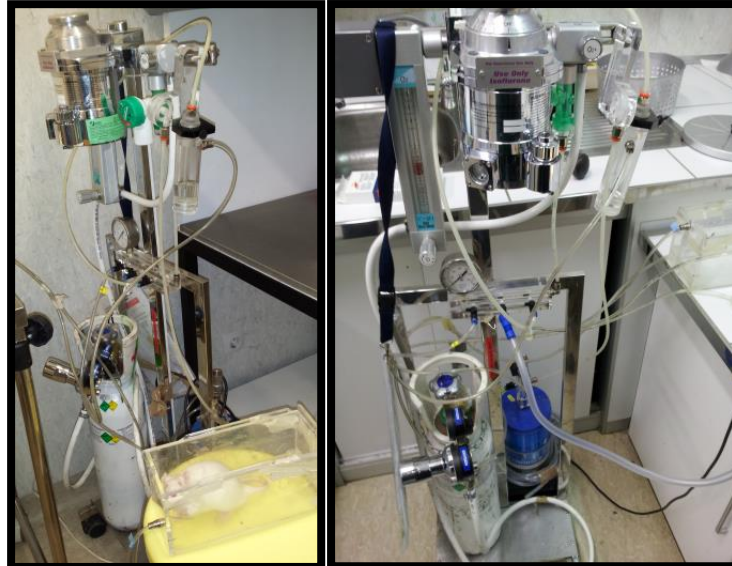


Figura 19: Equipo anestésico

2. D. TÉCNICA QUIRÚRGICA

2. D.1. Pseudo-operación

Con la rata en decúbito supino se realiza una laparotomía media xifopubiana, las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0,9%) a temperatura corporal, y son desplazadas hacia el lado izquierdo del animal. A continuación y, tras colocar un bloque de plastilina, cilindro de gasa o similar en la zona dorso lumbar, se secciona el ligamento falciforme, situado entre los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y caudado, y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho (Figura 20).

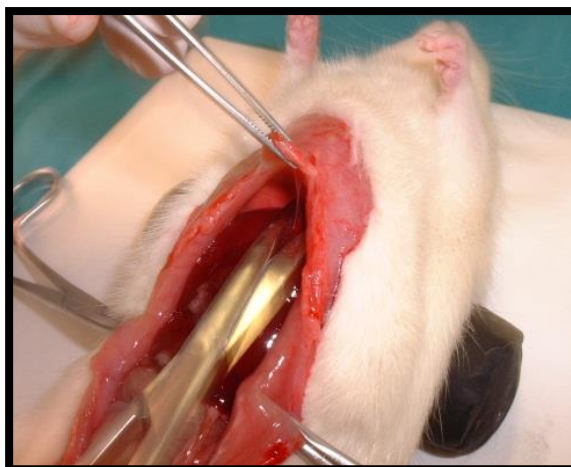


Figura 20: Laparotomía media y sección del ligamento falciforme.

Las maniobras anteriores permiten una exposición adecuada del hilio hepático y la tracción ligera del duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar, que es la estructura hiliar más superficial en la rata (Figura 21) (Aller et al. 1993; Aller et al. 2009). Tras disecar el colédoco, se introduce el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en dos planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible Vycril® (polyglactin 910) de 3/0, y piel con sutura continua de seda de 3/0 (Aller et al. 1993; Aller et al. 2009a).

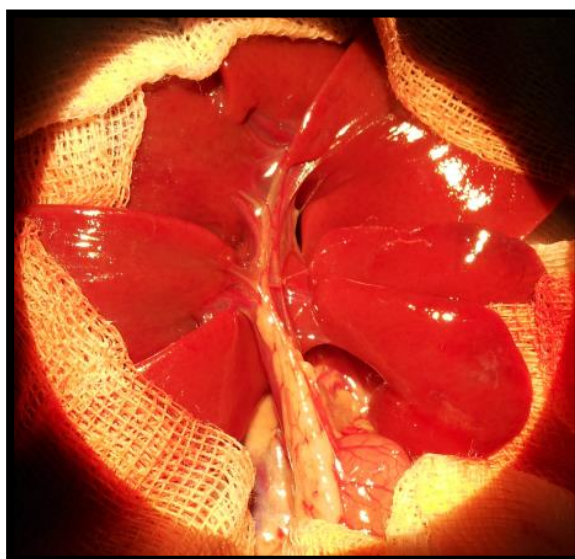


Figura 21: Exposición de la vía biliar (anterior respecto a las ramas de la arteria hepática, y éstas a su vez, anteriores respecto a las ramas portales)

2. D.2. Colestasis extrahepática microquirúrgica

El parénquima hepático en la rata está constituido por cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) y cada uno de ellos posee una vascularización portal y arterial, así como un drenaje venoso y biliar independientes (Figura 22) (Aller et al. 2008). Esta característica anatómica permite resecar los conductos biliares que drenan cada lóbulo hepático en continuidad con el colédoco mediante la utilización de una técnica microquirúrgica (Aller et al. 1993; Aller et al. 2009b).

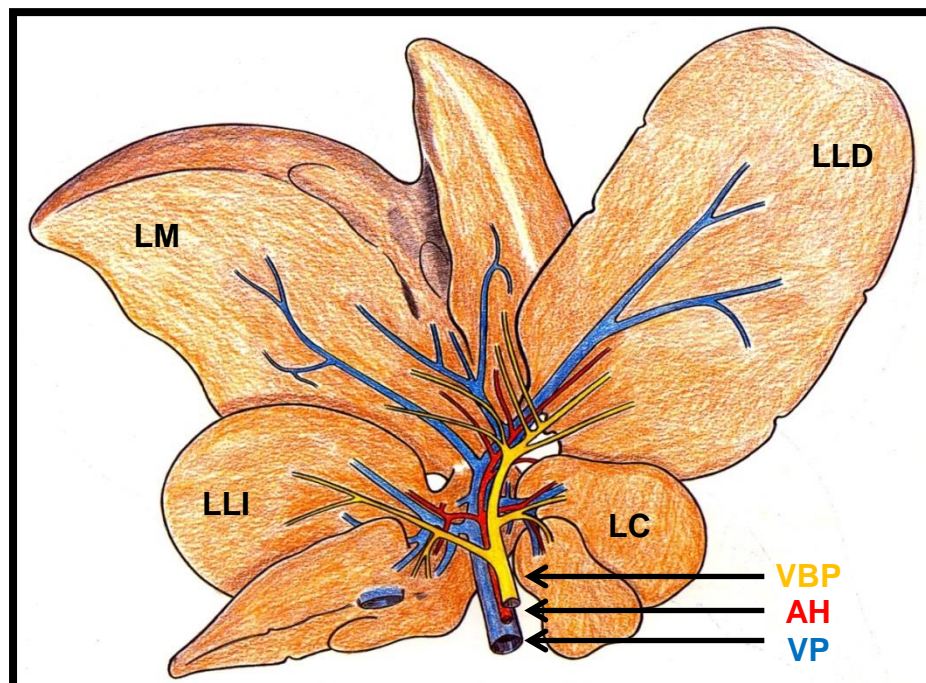


Figura 22: Representación del hígado de la rata dividido en cuatro lóbulos: medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC). En el hilio se puede apreciar la relación entre las ramas portales, arteriales y biliares, así como la ausencia de vesícula biliar. VBP, vía biliar principal (amarillo); AH, arteria hepática (rojo); VP, vena porta (azul).

Tras administrar anestesia inhalatoria con Isoflurano, y con el animal en decúbito supino, se realizó una laparotomía media xifopubiana y se seccionó el ligamento falciforme. A continuación se extrajeron las asas intestinales,

desplazándolas hacia el lado izquierdo del animal y se protegieron con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0,9%) a temperatura corporal. Después de colocar un bloque de plastilina, cilindro de gasa o similar en la zona dorso-lumbar los lóbulos hepáticos superiores se evirtieron sobre el tórax y también se cubrieron con una gasa empapada en suero salino fisiológico. Estas maniobras permitieron una correcta exposición de la totalidad de la vía biliar extrahepática. A continuación se seccionó el ligamento falciforme (situado entre el LLI y el LC), y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho (Figura 23).

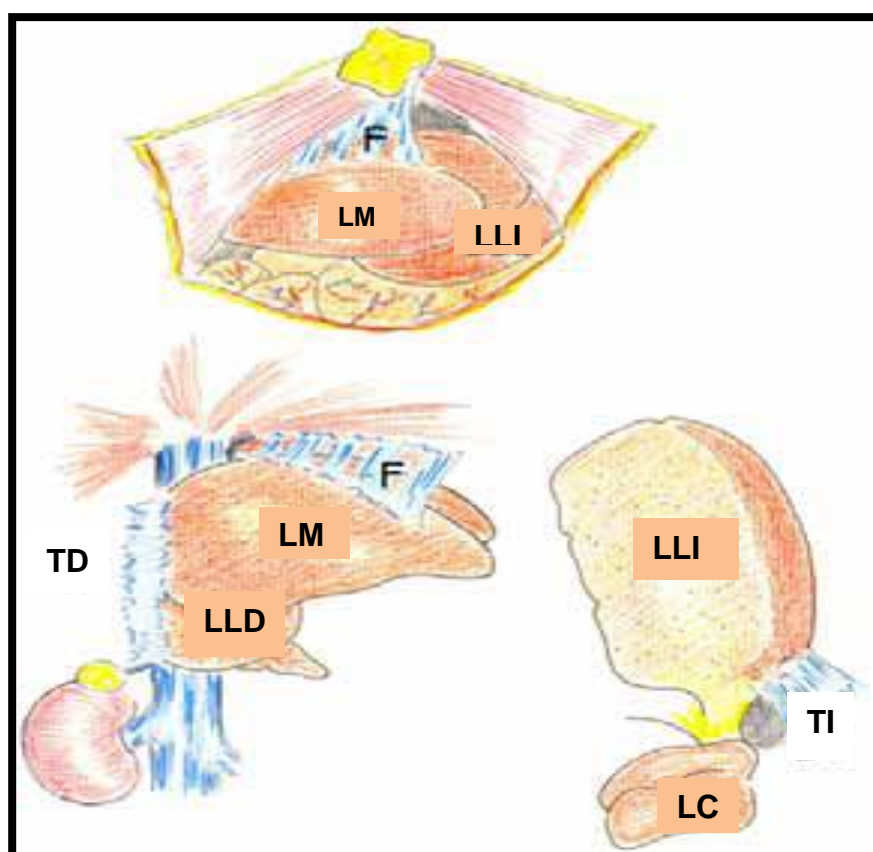


Figura 23: Ligamentos principales del hígado de la rata. F: Ligamento falciforme; TD: Ligamento triangular derecho; TI: Ligamento triangular izquierdo; LM: Lóbulo medio; LLI: Lóbulo lateral izquierdo; LMD: Lóbulo medio derecho; LMI: Lóbulo medio izquierdo; LLD: Lóbulo lateral derecho; LC: Lóbulo caudado.

Material y Métodos

Para las siguientes fases de la intervención fue necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación (Aller et al. 1993; Aller et al. 2009b; Aller et al. 2012), ya que la disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal ni arterial de estos lóbulos. La tracción del duodeno hacia la izquierda del animal permite visualizar el colédoco, que se liga con seda negra trenzada 6/0 Silkam[®] (B. Braun España) y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática (Figuras 24 y 25). Esta maniobra, al producir dilatación de la vía biliar extrahepática, previamente a su sección, facilita la identificación y posterior disección del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata.

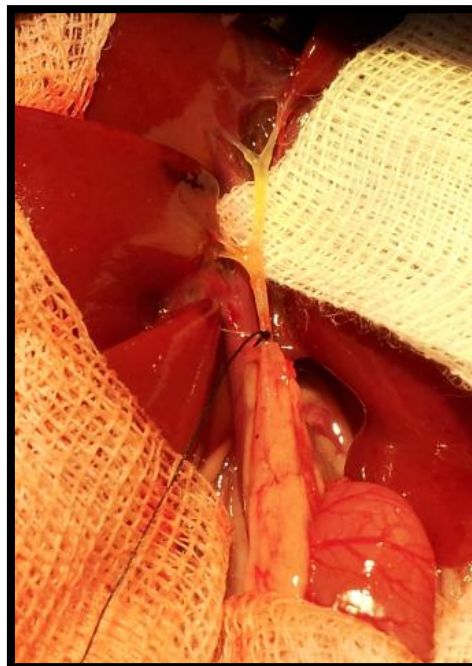


Figura 24: Ligadura de la vía biliar principal previa al inicio de su porción intrapancreática.

El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se disecciona hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC (Figura 25).

Después de disecar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático. La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma (Figura 26).

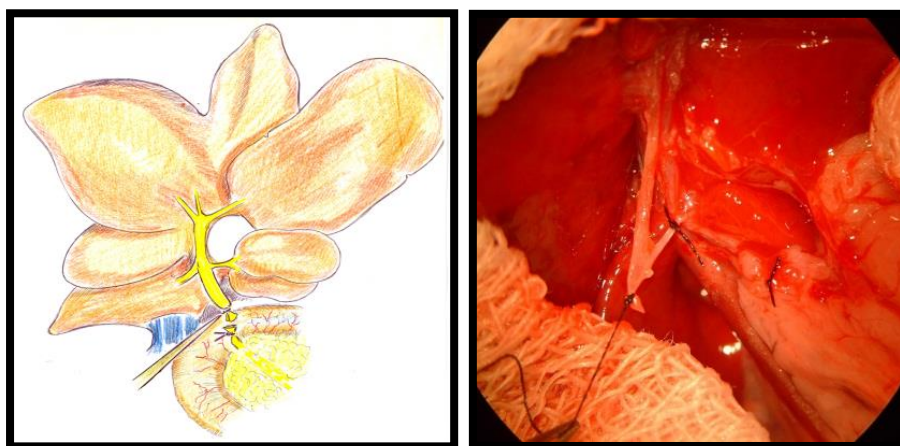


Figura 25. Tracción del extremo proximal ligado del colédoco y ligadura del conducto biliar procedente del LC.

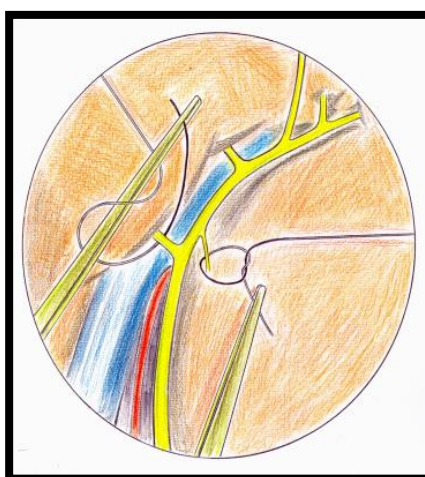


Figura 26. Disección y ligadura de los conductos biliares de LC y LLD en el hígado de la rata.

Se continúa la disección del colédoco en sentido craneal, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, e individualizándolo de la arteria

hepática y de la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del LM. Estos últimos se disecan y se ligan independientemente (Figura 27).

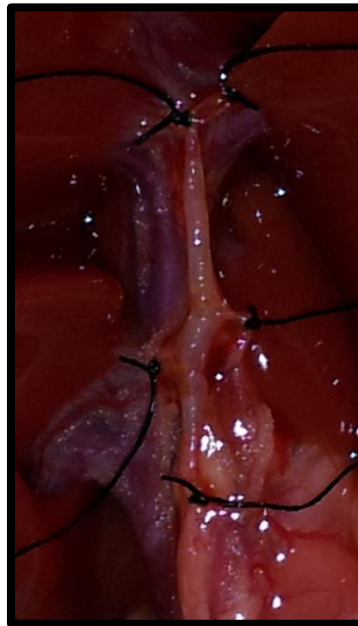


Figura 27: Ligadura del colédoco y de los conductos biliares procedentes de cada lóbulo hepático. Se aprecia la dilatación de la vía biliar al seguir un orden de disección y ligadura caudocraneal.

Finalmente, se disecciona, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI (Aller et al. 1993; Aller et al. 2009a; Aller et al. 2009b; Aller et al. 2012) y se extirpa la vía biliar (Figura 28).

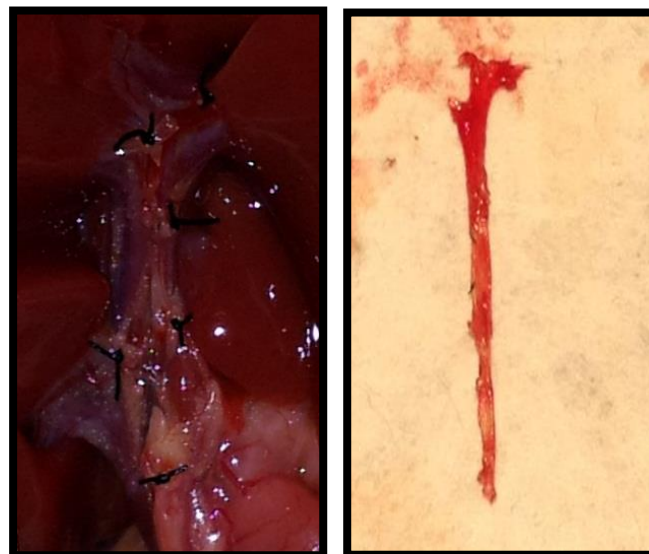


Figura 28: De izquierda a derecha 1: aspecto del hilio hepático de la rata una vez realizada la exéresis microquirúrgica de la vía biliar y de los conductos biliares. 2: vía biliar extirpada.

Previa comprobación de la integridad de la vascularización portal y arterial de los lóbulos hepáticos, así como, de la ausencia de hemorragia procedente de alguna lesión inadvertida del parénquima hepático (Figura 29), se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se administran por vía intraperitoneal 1,5 ml de solución salina isotónica (0,9%) o fisiológica para compensar las pérdidas hídricas producidas por la apertura de la cavidad abdominal durante la intervención quirúrgica. Por último, se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con sutura continua reabsorbible Vycril® (polyglactin 910) de 3/0 (Figura 29), y de la piel con sutura continua de Seda de 3/0 (Figura 29). Durante la intervención se mantuvo una temperatura estable, para así evitar la hipotermia, mediante el empleo de manta térmica a baja potencia.

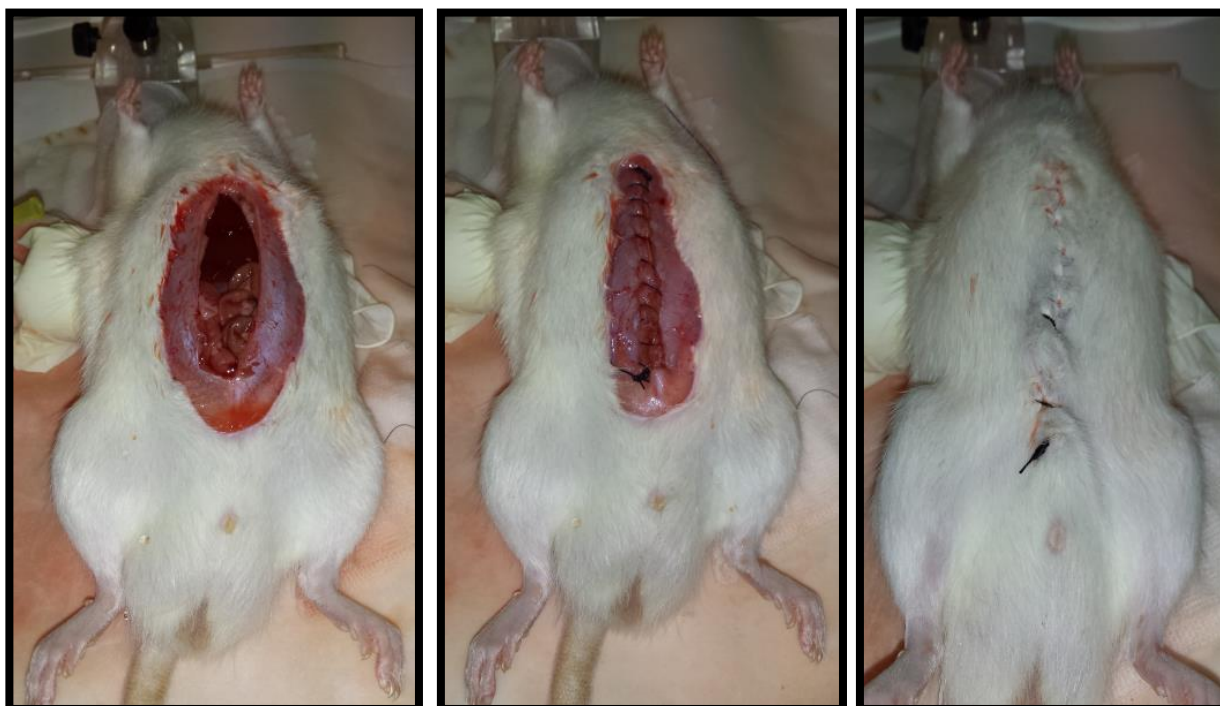


Figura 29: De derecha a izquierda 1: Infusión de suero salino fisiológico en cavidad abdominal. 2 y 3: cierre de laparotomía media por planos.

2. E. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención, las ratas se colocaron en su caja de policarbonato sobre un lecho de viruta especial para roedores de laboratorio que permite su estabulación en un medio limpio y seco, con luz poco intensa y en un ambiente tranquilo hasta que se recuperaron de la anestesia. Debido a la especial sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez et al 1999; Aller et al. 2009b), la prevención de la hipotermia postoperatoria es de fundamental importancia. Por ello, inmediatamente después de la intervención el animal se colocó cerca de una fuente de calor (una lámpara) y sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal en el rango aconsejado para las ratas adultas (25-30°C) (Waynforth et al. 2004).

Además, en los roedores es importante controlar la respiración durante el postoperatorio inmediato ya que es común la depresión respiratoria durante este periodo. Esta complicación es especialmente peligrosa ya que suele pasar inadvertida hasta que los animales sufren hipoxia e hipercapnia.

Durante una intervención quirúrgica, en particular si como en éste modelo experimental se realiza una laparotomía, se pierden abundantes fluidos por evaporación, lo cual se agrava en el post-operatorio inmediato ya que las ratas generalmente son incapaces de ingerir líquidos durante las primeras 12-24 horas. Por tanto, se deben aportar aproximadamente 40-80 ml/kg/24h preferiblemente por vía oral si el animal ha recuperado la conciencia. En caso de que no se haya recuperado del íleo paralítico se administra una solución salina-dextrosa (4% dextrosa, 0,18% salina) o salina (0,9%) por vía intraperitoneal o subcutánea (Aller et al. 2009b).

La realización de una laparotomía con manipulación de las asas intestinales y resección de la vía biliar en la rata cursa con un importante dolor postoperatorio. En particular, las ratas Wistar tras sufrir una laparotomía adoptan posturas sugerentes de dolor abdominal arqueando la espalda, aumentan su frecuencia respiratoria y reducen la ingesta de líquidos y sólidos. Por éste motivo, como terapia analgésica se administró el opioide buprenorfina (0,05 mg/ kg/ 12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas de postoperatorio (Aller et al. 2009b). La buprenorfina ha sido muy utilizado en medicina veterinaria durante las últimas tres décadas porque proporciona un nivel de analgesia excelente y produce una mínima depresión cardíaca y/o respiratoria.

Los animales fueron sacrificados a las 8 semanas postoperatorias. Durante este periodo se les administró por vía i.m. profunda un antibiótico de amplio espectro, concretamente ceftazidima 50 mg/ kg dos veces a la semana y, vitamina K1, fitomenadiona 8 mg/ kg una vez a la semana, como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente (Aller et al. 2009b).

2. F. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Los animales fueron sacrificados mediante inhalación de anestésico y posterior decapitación, a las 8 semanas del postoperatorio. Antes de proceder al sacrificio de los animales se determinó su peso corporal final (PCF). Tras el sacrificio se realizó la necropsia. Se colocó al cadáver de la rata en decúbito supino se practicó una laparotomía xifopubiana. Se realizó estudio macroscópico de la cavidad abdominal, en el que se valoró, a saber; el aspecto macroscópico de hígado y bazo, la presencia de signos macroscópicos sugerentes de hipertensión portal tales como

la circulación colateral portosistémica o la vasculopatía venosa mesentérica, y se determinó la presencia de líquido ascítico. De esta manera durante el sacrificio, y de forma sistemática, se valoraron los siguientes aspectos:

2. F.1. Circulación colateral portosistémica

A continuación, se estudiaron aquellas regiones donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa en ratas con hipertensión portal, que concretamente, son el área esplenorrenal (CER), la región gastroesofágica (colaterales paraesofágicas, CPE) y el área pararrectal (CPR) (Figura 30).

- Área Esplenorrenal: Se establece entre la vena esplenorrenal superior (craneal, anterior o proximal) y la vena esplenorrenal inferior (caudal, posterior o distal), que drenan a distinta altura en la vena suprarrenal izquierda.
- Área Gastroesofágica: Las colaterales paraesofágicas son dos venas tortuosas y de grueso calibre que ascienden por la cara anterior y posterior del esófago. Respectivamente, vena paraesofágica anterior y vena paraesofágica posterior.
- Área Colorrectal: Se localiza en la región de la vena mesentérica inferior, que se continúa con las venas hemorroidales en situación pararrectal izquierda.

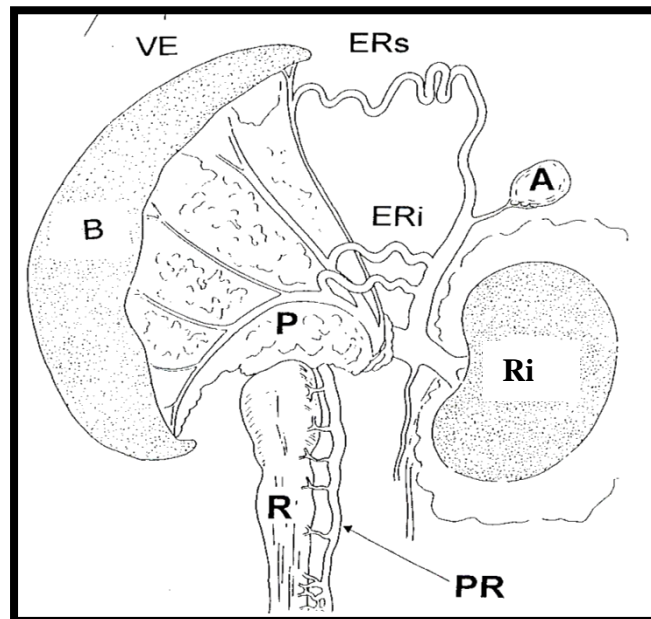


Figura 30. Representación de circulación colateral porto-sistémica tras colestasis microquirúrgica en la rata. Ri: Riñón; A: Glándula adrenal; B: Bazo; P: Páncreas; ERs: Circulación esplenorrenal superior; ERi: Circulación esplenorrenal inferior; R: Recto; PR: Circulación pararectal.

2. F.2. Vasculopatía venosa mesentérica

Se denomina vasculopatía venosa mesentérica a la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Se consideran tres grados de vasculopatía venosa mesentérica (Corcuera Pindado et al. 2005; García-Domínguez et al. 2010; Kruse et al. 2010; Xavier et al. 2010):

- *Grado 0*: aspecto macroscópico normal de las ramas de la vena mesentérica superior.
- *Grado I*: dilatación y tortuosidad de las ramas mesentéricas, secundarias al clampaje transitorio, de 1 minuto de duración, de la vena mesentérica superior.
- *Grado II*: dilatación y tortuosidad espontáneas de las ramas de la vena mesentérica superior.

Material y Métodos

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior (Figura 31). Esto es, las ramas de primer y segundo orden o proximales, por su vecindad con la vena mesentérica superior, y las de tercer y cuarto orden o distales, por su vecindad con el intestino, íleon y ciego (Corcuera Pindado et al. 2005).

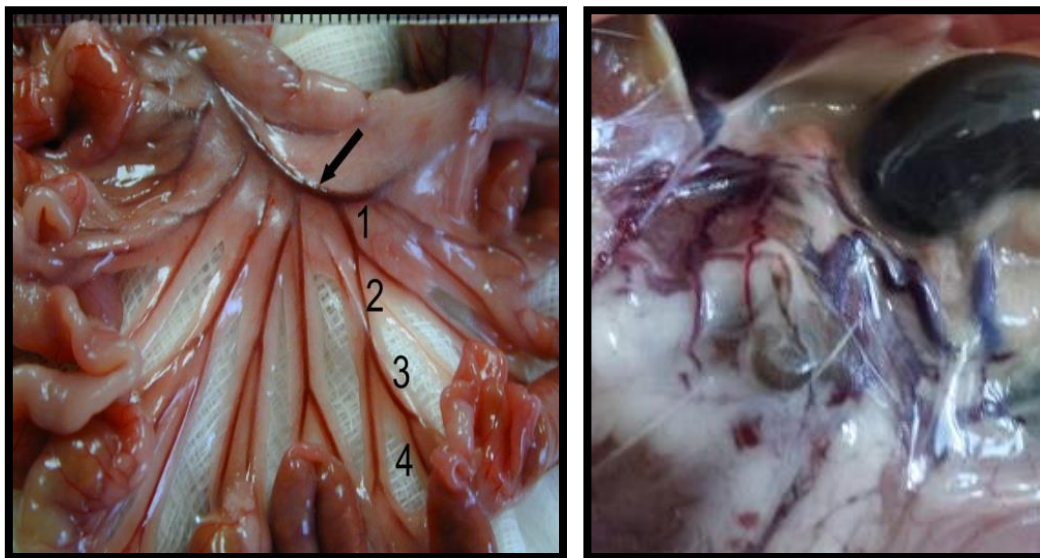


Figura 31: De izquierda a derecha, 1: Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden. Imagen de la izquierda. 2: Vasculopatía a nivel esplenorrenal.

2. F.3 Extracción sanguínea

Tras realizar el estudio macroscópico de la cavidad abdominal y valorar los signos macroscópicos sugerentes de hipertensión portal, como son el desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica y de circulación venosa colateral, se procedió a la recogida de sangre. Para la colección de la sangre se emplearon alícuotas. La sangre se conservó refrigerada en hielo, a 4°C durante 2 horas, y posteriormente se

centrifugó a 2000 G durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante que constituía el plasma, el cual se almacenó en nuevas alícuotas, que se congelaron a -80 °C hasta su utilización para la determinación de diferentes aminoácidos.

2. F.4 Recogida del hígado

A través de la apertura de la laparotomía previa se procedió a la extracción del hígado. Los lóbulos hepáticos se diseccionaron y se registró el peso del hígado total y de cada uno de sus lóbulos (Figura 32).

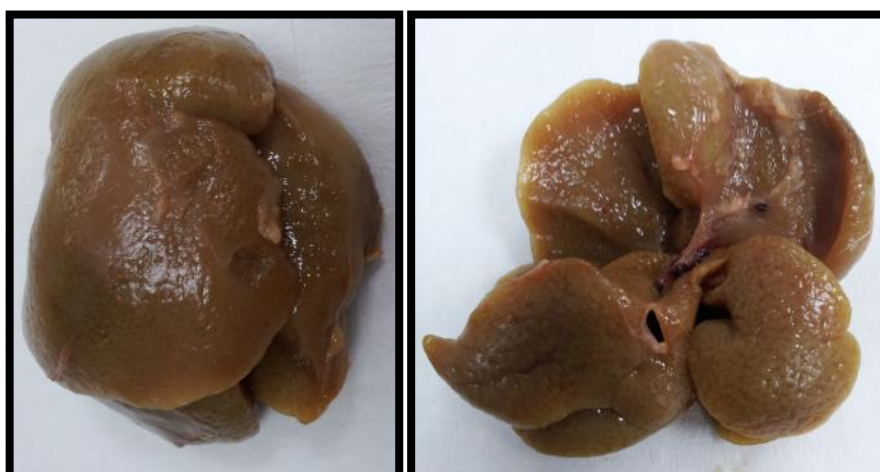


Figura 32: Muestra de hígado, cara externa e hilio.

2. F.5 Extracción cerebral y de arteria cerebral media

Tras la decapitación se procedió a la individualización del cerebro y a la disección de la arteria cerebral media y del resto de arterias cerebrales de cada rata. Las muestras de cerebro fueron etiquetadas y congeladas en un arcón a -80°C con celeridad, para su posterior estudio y análisis. Las muestras de ACM fueron etiquetadas e introducidas en una solución de KHS oxigenada con una mezcla al 95% de O₂ y al 5% de CO₂, y mantenida a 4°C, para su posterior estudio. Las

Material y Métodos

muestras del resto de arterias cerebrales recolectadas, destinadas a la determinación de factores vasoactivos, se mantuvieron a 4°C, se pesaron y posteriormente se congelaron para el análisis de la expresión de proteínas.

2. F.6 Disección de núcleos cerebrales

Las muestras cerebrales fueron tomadas en el momento del sacrificio realizándose extracción del cerebro del cráneo y de las meninges. Se conservó congelado en fresco a -80°C (Figura 33).

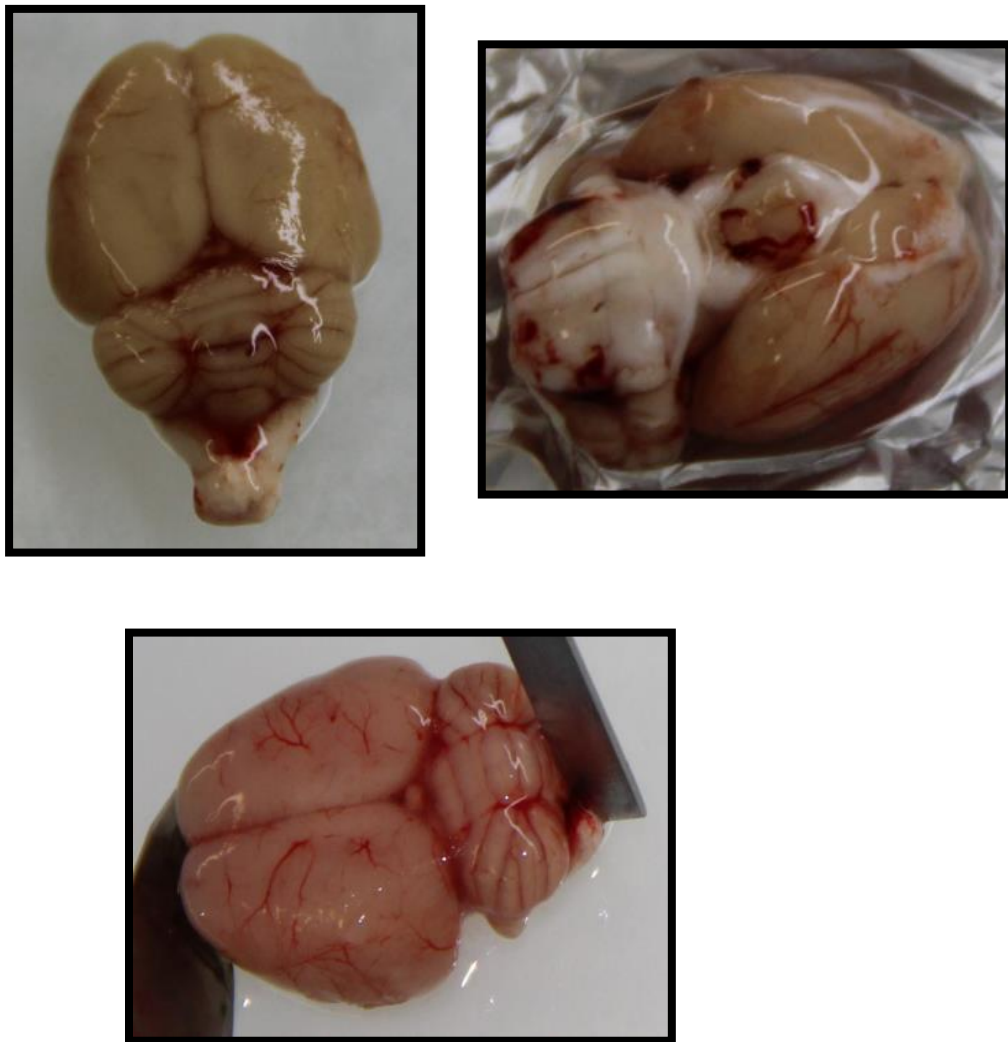


Figura 33. De superior a inferior: Muestra A) Imágenes 1ª y 2ª: cerebro de rata sometida a colestasis extrahepática microquirúrgica; Muestra B) Imagen 3ª: cerebro de rata pseudooperada.

Se descongelan las muestras. Se procedió a diseccionar los diferentes núcleos a estudio empleando bisturí frío, pinzas de disección microquirúrgica y pala microquirúrgica (Figura 34).



Figura 34: Extracción de los núcleos cerebrales.

Los núcleos extraídos fueron los siguientes: corteza prefrontal, corteza prefrontal medial, tallo cerebral, cerebelo, hipotálamo, tálamo, hipocampo, núcleo estriado dorsal. Se procesaron hipotálamo, núcleo estriado dorsal y cerebelo. Tras ello, las muestras de cada sujeto fueron almacenadas individualmente en eppendorfs que previamente habían sido pesados en balanza de precisión (Precisa® ISO 9001. Figura 35) y etiquetados correspondientemente con número de sujeto y estructura que contiene. Las muestras se congelaron nuevamente a -80°C en arcón frigorífico.

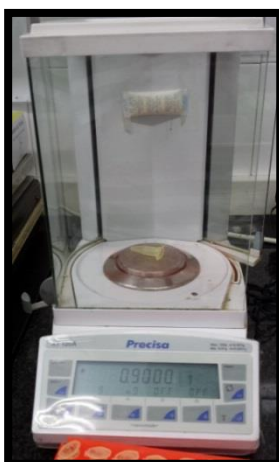


Figura 35: Balanza de precisión (Precisa® ISO 9001).

2. F.7. Eliminación de los restos biológicos

Una vez tomadas las muestras, los restos de los animales y los tejidos desechados fueron depositados en bolsas plásticas e introducidos en contenedores especiales para ese fin. La gestión de los restos biológicos, recogida, transporte y tratamiento de los mismos, se realizó a través de la empresa Consenur S.A., C/Rio Ebro s/n, Polígono Industrial Finanzauto, Arganda del Rey (Madrid), que cumplía con la normativa vigente; decreto 83/1999, de 3 junio (última revisión 31 marzo 2003), por el que *se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos* en la Comunidad Autónoma de Madrid.

2. G. ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS EN ARTERIAS CEREBRALES

Para realizar los experimentos de liberación de sustancias vasoactivas y expresión de proteínas, se diseccionó la arteria cerebral media y el polígono de Willis. Para realizar los experimentos de reactividad vascular, se extrajo cuidadosamente la ACM, se limpió de tejido conectivo y se almacenó en solución KHS a 4°C.

2. G.1 Colección de muestras

Arterias cerebrales de ambos grupos de ratas se estabilizaron durante 30 minutos en 5 ml de KHS a 37°C, burbujeado continuamente con una mezcla de 95% de O₂ y de 5% de CO₂. Tras varios periodos de lavado en un baño de 0,2 ml de KHS se recolectó y congeló el medio resultante para medir la liberación basal de los distintos factores vasoactivos. Tras reponer el medio, las arterias se expusieron a

concentraciones crecientes y acumulativas de BK (0,1 nmol/L -10 μ mol/L) en intervalos de 2 minutos. Se recogió el medio para medir la liberación de los factores vasoactivos inducida por BK. Las distintas muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su posterior análisis. El tejido utilizado se pesó para poder normalizar los resultados posteriores en función de la cantidad de tejido utilizada.

2. G.2 Protocolos utilizados para la determinación de cada metabolito problema.

Empleo de los kits comerciales correspondientes

2. G.2. A Determinación de óxido nítrico:

Para establecer la determinación de óxido nítrico, se cuantificó su metabolito estable nitrito, utilizando el kit comercial Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric, Abcam[®] UK), basado en el protocolo de Griess (Griess et al. 1979). Brevemente, las muestras y la curva patrón se transfieren a una placa ELISA y se incuba con nitrato reductasa, para transformar todo el nitrato en nitrito. Posteriormente, se incuba con los reactivos de Griess y se leerá inmediatamente la placa a 540 nm. Los resultados se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante, interpolando en la curva estándar realizada, se expresaron como nmol nitrito/ mg tejido.

2. G.2. B Determinación de TXA₂ y de PGI₂

La cuantificación de TXA₂ y PGI₂ producidos se llevó a cabo valorando sus metabolitos estables TXB₂ y 6-ceto PGF_{1 α} , respectivamente, mediante los kits comerciales Thromboxane B₂ EIA Kit y 6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA Kit (Cayman Chemical Company[®], U.S.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos ensayos se basaron en la exposición de las muestras a analizar a un antisuero de

conejo y en la competición entre el prostanoide a determinar y la solución trazador, compuesta por prostanoide conjugado con acetilcolinesterasa (AChE). La cantidad de trazador se mantuvo constante mientras que la concentración del prostanoide a analizar varió con la muestra. La cantidad de trazador que es capaz de unirse a los sitios de unión del antisuero de conejo será inversamente proporcional a la concentración de TXB_2 en el pocillo. El complejo *antisuero de conejo-prostanoide* (libre o con trazador) se unió a los anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgG de conejo que recubrían la pared del pocillo. La placa se reveló utilizando el reactivo Ellman, que contenía el sustrato de la AChE, tras cuya aplicación la placa se leyó a una longitud de onda entre 405 y 420 nm. Los resultados se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante, interpolando en la curva estándar realizada, y se expresaron como ng TXB_2 / ml mg tejido o como ng 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ / ml mg tejido.

2. G.2. C Determinación de Endotelina 1

Se cuantificó la producción de ET-1 en ambos grupos experimentales. Se utilizó el kit comercial Endothelin 1 ELISA Kit (Abcam[®], U.K.), siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las muestras y la curva patrón se transfirieron a una placa ELISA recubierta con un anticuerpo de ratón que reconoce específicamente ET-1. Posteriormente se incubó con un anticuerpo específico contra ET-1, conjugado con peroxidasa, y a continuación con el sustrato para la peroxidasa 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). Tras parar la reacción con 1 N HCl se leyó inmediatamente la placa a 450 nm, con corrección entre 570 y 590 nm. Los resultados se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante, interpolando en la curva estándar realizada, y se expresaron como pg ET-1/ ml mg tejido.

2. H. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS

2. H.1 Preparación de muestras

Se diseccionaron las arterias cerebrales de ambos grupos de animales, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Las arterias congeladas se homogeneizaron mecánicamente en un tampón de extracción (composición detallada en el apartado de material) y se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4°C. El contenido proteico se analizó, utilizando el kit comercial DC protein assay kit (BioRad®), basado en un ensayo colorimétrico similar al ensayo de Lowry (Lowry et al. 1951). El ensayo consiste en la reacción de las proteínas con una solución alcalina de tartrato sódico con el reactivo de Folin, y se compone de dos pasos: la reacción entre la proteína y el cobre en medio alcalino y la consecuente reducción del reactivo de Folin por acción de las proteínas tratadas con cobre. El desarrollo del color se debe principalmente a los aminoácidos tirosina y triptófano, y en menor medida a cistina, cisteína e histidina (Lowry et al. 1951). Las proteínas ejercen una reducción en el reactivo de Folin por pérdida de 1, 2 ó 3 átomos de oxígeno, produciendo así una o más especies reducidas con un color azul característico, con un máximo de absorción a 750 nm y un mínimo a 405 nm. Dicha lectura se realizó en un lector de placas (Multiskan Ascent, Labsystems®) utilizando el programa Ascent Software®. La concentración de proteínas se determinó por interpolación en una curva patrón elaborada a partir de distintas concentraciones de albúmina de suero bovino. Tras la determinación proteica, las proteínas a separar se extrajeron en un tampón de rotura y solubilización, tampón (Laemmli 1970) en el que se resuspendieron estos extractos. Las muestras se

llevaron a ebullición durante 10 min, y se tomó el volumen adecuado para introducir 40 µg de proteína de cada muestra en los pocillos del gel.

2. H.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, usando un tampón de electroforesis (Laemmli 1970). La concentración de poliacrilamida en el gel de separación fue del 7,5% (p/v) para determinar la expresión de las distintas isoformas de NOS o del 10% (p/v) para analizar la expresión de las isoformas de COX, TXA₂ sintasa, PGI₂ sintasa y ECE-1. El gel de concentración se preparó con un 5% (p/v) de acrilamida. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 97 V en un sistema Mini-PROTEAN TETRA CELL (Bio-Rad®), utilizando una fuente de alimentación PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad®).

2. H.3 Electrotransferencia y detección inmunológica

Las muestras ya separadas se transfirieron electroforéticamente a un soporte sólido, consistente en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad Immun-Blot®) de 0,2 µm de diámetro de poro, en un aparato de transferencia vertical (Mini Trans-Blot, BioRad®), usando como tampón de transferencia (composición detallada en apartado de material). La transferencia se realizó a 4°C durante 14 horas, utilizando una intensidad constante de 230mA, proporcionada por la fuente de alimentación PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad®).

Una vez transferidas e inmovilizadas las muestras en la membrana de PVDF, se procedió a la detección inmunológica según el siguiente protocolo:

- Bloqueo de la membrana en TBS (0,100 mol/L pH 7,4 Tris-HCl, 0,9% p/v NaCl, 0,1% SDS) con BSA al 5% p/v (tampón de bloqueo) durante 1 hora.
- Incubación con el anticuerpo primario correspondiente, diluido según el título del mismo, en tampón de bloqueo durante 12 horas a 4°C en agitación. En esta determinación se emplearon los siguientes anticuerpos primarios:
 - Anticuerpo monoclonal anti-eNOS (1:1000, Transduction Laboratories[®], Lexington, UK).
 - Anticuerpo policlonal anti eNOS fosforilada en el residuo de Ser 1177 (1:1000 dilution; Abcam Laboratories[®]).
 - Anticuerpo monoclonal anti-nNOS (1:2500, Transduction Laboratories[®], Lexington, UK).
 - Anticuerpo policlonal anti-nNOS fosforilada en el residuo de Ser 1417 (1:1000 dilution; Abcam Laboratories[®]).
 - Anticuerpo monoclonal anti-iNOS (1:1000, Transduction Laboratories[®], Lexington, UK).
 - Anticuerpo policlonal anti-TXA₂ sintasa (1:500, Cayman Chemical[®], USA).
 - Anticuerpo policlonal anti-PGI₂ sintasa (1:500, Cayman Chemical[®], USA).
 - Anticuerpo policlonal anti-ECE-1 (1:500, Abcam Laboratories[®]).
 - Lavados con TBS-T (TBS + 1% Tween-20)
- Incubación con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-IgG de conejo o ratón, obtenido en cabra, conjugado con actividad peroxidasa de Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, diluido 1:1000), en tampón de bloqueo durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

- Revelado, utilizando un Kit de revelado, Amersham ECL™ Western Blotting Detection Kit, según las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech®, Piscataway, NJ), utilizando el sistema de obtención de imágenes ChemiDoc™ MO System (Bio-Rad®).
- La misma membrana se utilizó para determinar la expresión de β -actina, para corregir la expresión de cada muestra, utilizando un anticuerpo monoclonal anti β -actina conjugado con peroxidasa (1:50000, Sigma-Aldrich®, Spain).

El análisis de las bandas obtenidas se realizó mediante el programa Scion Image for Windows® (2000 Scion Corporation®).

2. I. ESTUDIO DE REACTIVIDAD VASCULAR

2. I.1. Preparación y montaje

Los ensayos de reactividad vascular se realizaron siguiendo el método descrito por Mulvany y Halpern en 1977 (Mulvany & Halpern 1977), utilizando un miógrafo de alambres apropiado para el montaje de arterias de pequeño calibre (Multi Wire Myograph System - 620M, Danish Myo Technology A/S®, Åarhus, Denmark). Para ello, se utilizaron segmentos de ACM de 2 mm de longitud, a los que se introdujeron dos alambres de tungsteno de 40 μ m de diámetro a través de la superficie luminal.

A su vez, este miógrafo se conectó a un sistema de registro de datos PowerLab®, que permitió grabar los cambios percibidos en la tensión arterial, en el programa informático Chart 5 (v5.5.2) (Figura 36).



Figura 36: elementos básicos del Sistema de Mulvany y Halpern (1976).

2. 1.2. Desarrollo del experimento de reactividad vascular

Tras un periodo de estabilización de 30 min en KHS a 37°C y burbujeado con una mezcla de gases, 95% de O₂ y 5% de CO₂, para oxigenar el tejido y mantener un pH de 7,4, las arterias se estiraron gradualmente hasta conseguir su tensión óptima en función de su diámetro. Basándose en la relación entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso, y a partir de ella, la circunferencia interna correspondiente a una presión transmural de 100 mm de Hg para un vaso relajado *in situ* (L_{100}) (Mulvany & Halpern 1977). Para la realización de los experimentos, las arterias se situaron con una circunferencia interna L_1 , siendo $L_1=0,9 \times L_{100}$, circunferencia a la cual el desarrollo de fuerza es máximo. El diámetro luminal efectivo se determinó como $l_1=L_1/\pi$.

Tras el proceso de normalización, se lavaron los segmentos arteriales y se equilibraron durante 30 min. A continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de los mismos a una solución de alta concentración de KCl (KHS-K⁺, 120 mmol/L). Posteriormente, los segmentos de ACM se contrajeron con una concentración de 5-HT que indujo una contracción aproximada a un 50%–70% de la contracción máxima obtenida por KHS-K⁺. La presencia de endotelio funcional se determinó por la capacidad de 1 μmol/L de BK para producir relajación en arterias precontraídas con 5-HT. Se consideraron segmentos con endotelio

funcional aquellos que relajaban con la mezcla de BK más de un 50% del tono previo obtenido con 5-HT. A continuación, se determinó si existían diferencias en la relajación dependiente de endotelio entre los segmentos de ACM de ratas PS y colestásicas mediante la realización de curvas de BK (0,1 nmol/L-10 μ mol/L) en segmentos precontraídos con 5-HT.

2. J. DETERMINACIÓN AMINOÁCIDOS EN TEJIDO CEREBRAL Y EN PLASMA

2. J.1. Técnica para la determinación de aminoácidos

Los niveles de los siguientes aminoácidos: Ácido L-Glutámico (L-Glutamato), Ácido L-Aspártico (L-Aspartato), Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina, L-Arginina y GABA (éste último no se determinó en plasma), se cuantificaron con un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter® PA800 (Figura 37) mediante la técnica de cromatografía electrocinética micelar con detección con fluorescencia inducida por láser (Miguéns et al. 2013). Esta técnica es una variante de la electroforesis capilar en la que un surfactante hace las funciones que tiene la fase fija en la cromatografía líquida. Para mejorar la separación se añadieron ciclodextrinas, que mediante su capacidad de acomplejar son un factor añadido de selectividad y permiten realizar la separación de los isómeros L y D de ciertos aminoácidos.



Figura 37: Equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter® PA 800

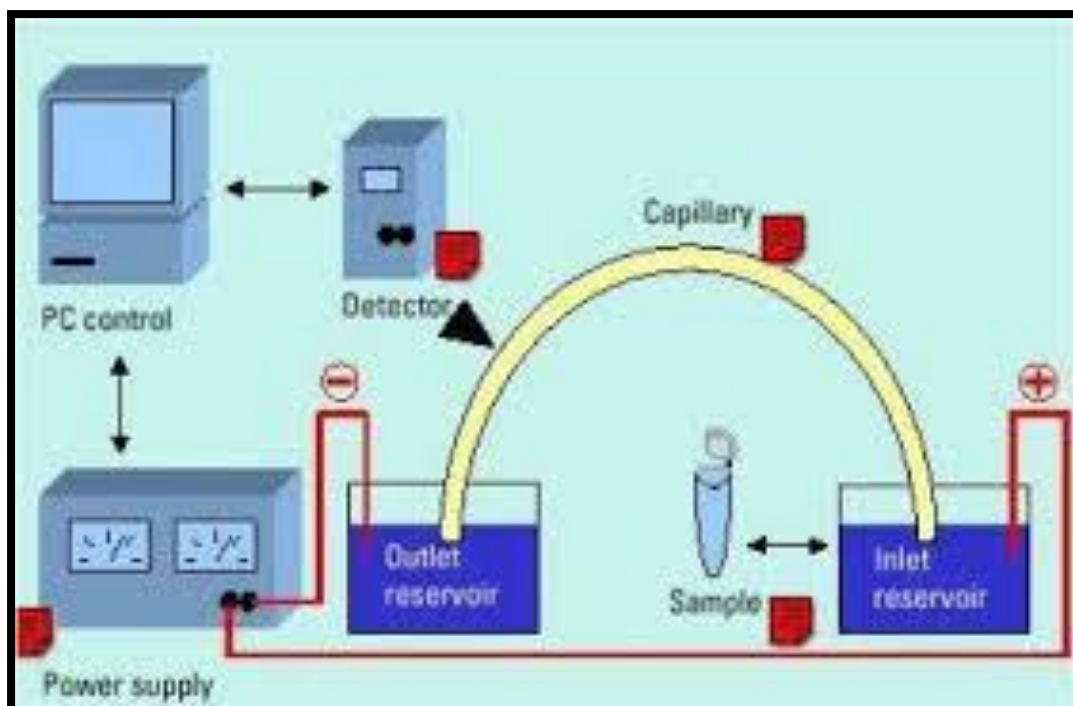


Figura 38: Esquema de funcionamiento de un equipo de electroforesis capilar

La electroforesis capilar se fundamenta en la aplicación de una elevada corriente, hasta 30 kV, en los extremos de un capilar de sílice fundido de 25-100 μm de diámetro interno, recubierto de poliamida y que contiene una solución electrolítica conductora (Figura 38). La migración de sustancias se produce desde el ánodo, donde se inyecta la muestra, hasta el cátodo donde se cierra el circuito eléctrico. Antes de llegar al cátodo, los analitos pasan por una ventana donde incide una luz láser de 488 nm que es percibida por un detector que la cuantificará en unidades de fluorescencia relativa (RFUs).

2. K. DETERMINACIÓN DE AMINOACIDOS EN TEJIDO CEREBRAL

2. K.1. Disección de muestras de cerebro

Las muestras congeladas de cerebro, y de plasma, fueron trasladadas a la Facultad de Psicología de la UNED, sin romper en ningún momento la cadena de frío.

Entonces, los cerebros congelados se diseccionaron macroscópicamente para separar los diferentes núcleos cerebrales a estudio. Para ello se descongelaron las muestras, y bajo visión directa empleando material microquirúrgico como pinzas y bisturí frío se procedió a la disección de estructuras (*hipotálamo, núcleo estriado dorsal, cerebelo, corteza prefrontal, corteza prefrontal medial, hipocampo, tálamo, tallo cerebral*) y a su almacenaje en eppendorfs clasificados a -80°C, para su posterior análisis.

2. K.2. Procesado de muestras de tejido cerebral

2. K.2. A Homogenización

Se procedió a pesar las muestras y a añadir a las mismas un tampón de homogeneización (TH) en cantidad necesaria acorde al peso de cada muestra, concretamente a razón de 10 µl de TH por cada mg de muestra.

Las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente con lanceta junto con 150 µl de TH. Tras ello se añadió el resto de TH necesario, para llegar a la proporción mencionada previamente, restando los 150 µl añadidos anteriormente para homogeneizar mecánicamente el tejido.

Se realizó la primera centrifugación de las muestras, con parámetros de 2000 g a 4°C y durante 10 min. Inmediatamente después se extrajo el *sobrenadante*

primero (S1) que se colocó en otros *ependrofs* nuevos, tras ello se realizó un lavado del *pellet* con 150 µl de TH y se añadió el resto hasta 10 µl TH/ mg tejido.

Tras estos pasos, se realizó la segunda centrifugación a 1000 g, 10 min a 4°C y se realiza la extrajo el *sobrenadante segundo (S2)*.

Por último, se juntaron ambos sobrenadantes congelándose a -70°C, así como ambos *pellet*.

2. K.2. B. Filtración

Estándar interno: Consiste en un aminoácido que se añade como *testigo* en todas las muestras, que debe ser igual en todas ellas y que permite compensar errores acumulativos o alteraciones en las condiciones ambientales que puedan introducir sesgos en la valoración de los aa.

El estándar interno empleado fue el *ácido D-glutámico* y en el caso de los tejidos se añade a la propia muestra (distinto que en el plasma donde se añadió al *MIX* de buffer, FITC y estándar interno).

La solución muestra más el estándar interno, se filtró con un filtro de 0,22 µm y se congeló a -70°C.

2. K.2. C Derivatización de muestras y patrones

Derivatizar consiste en unir dos componentes. Lo que se pretendió en este caso fue unir los aa de la muestra con un fluoróforo. Esto permitió cuantificar los aa de la muestra en función de la cantidad de fluorescencia emitida a la longitud de onda del fluoróforo. La separación electroforética consiguió identificar cada aa al compararlo con un patrón de referencia. Como fluoróforo se empleó isotiocianato de fluoresceína isómero-1 (FITC) con una concentración en tejido de 3 mM en acetona y para el plasma de 4,5 mM. El FITC tenía una longitud de onda de excitación de 494 nm y de emisión de 518 nm.

Tanto muestras como patrones se mezclaron a razón de 12 µl de muestra, previamente filtrados (0,22 µm), junto con 28 µl de una solución *MIX* compuesta por cinco partes de tampón borato (5 mM, pH 9,6) más dos partes de disolución de FITC en acetona*. Una vez agitados se mantuvieron preservados de la luz durante 20 horas y a una temperatura estable de 23°C. Transcurrido este tiempo, se conservaron a -70°C, hasta el proceso de análisis químico.

* Para las muestras y patrones de plasma este buffer contiene el estándar interno *ácido D-glutámico*, 5 µl de una solución 7,5 mM en 5 ml de buffer.

2. K.2. D Medición de aminoácidos

La muestra se trasladó al aparato de electroforesis capilar para iniciar la independización de aa, la medición de fluorescencia, y el establecimiento de las curvas para que se correlacionen con la cantidad de aa medidos, comparado con un patrón que ha calibrado el aparato, y que nos permita calcular el área bajo la curva (AUC) en los picos de aa que, a su vez, se correlacionará con las concentraciones de cada uno de ellos (Figura 39).

El protocolo de análisis empleado fue una modificación de el de Hua (Hua et al. 2010).

Se realizaron rectas de calibrado para los analitos: L-aspartato, L-glutamato, taurina, glicina, L-alanina, L-serina, L-arginina y GABA. Todas las rectas de calibrado tuvieron un $r^2 \geq 0,99$.

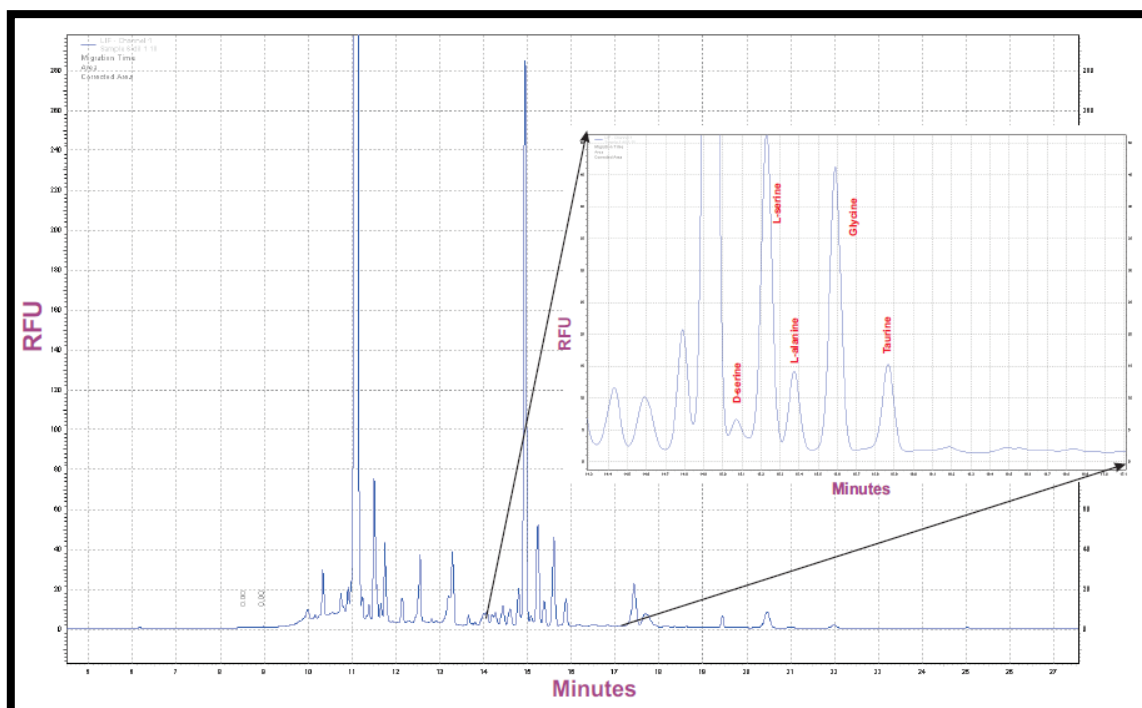


Figura 39: Electroferograma característico del método de análisis empleado. Se representan los picos de analitos cuantificados para L-serina, L-alanina, glicina, taurina.

Los capilares fueron tratados con 1 mol/L NaOH durante 60 min, seguido de agua desionizada durante otros 60 min a temperatura ambiente.

Entre análisis, el capilar se acondicionó mediante 100 mmol/L ClH (2 min), H₂O desionizada (1 min), 0,1 mol/L NaOH (2 min), H₂O desionizada (1min), buffer borato (2 min).

Las muestras y los patrones se diluyeron 1:20 con solución buffer y posteriormente se inyectaron hidrodinámicamente en el capilar durante 5 segundos con una presión de 0,5 pascales por pulgada.

Las condiciones de análisis fueron: solución tampón borato (pH 10,2) compuesto por 70 mmol/L SDS, 5% metanol, 17,5 mmol/L HP-CD; 5mM DM-CD; 23kV y temperatura del capilar de 25°C.

Mediante el software de Beckman Coulter® KARAT 32 se cuantificó el área corregida del pico correspondiente a cada analito (que consiste en una integración matemática de la geometría del pico que reduce problemas de interferencia con los picos adyacentes) aplicando a este área la recta de calibrado correspondiente. .

2. L. DETERMINACIONES AMINOACIDOS EN PLASMA

2. L.1. Obtención y preparación de muestras de plasma

Tras el sacrificio, la muestra sanguínea se conservó heparinizada (100µl), para evitar su coagulación, refrigerada en hielo a 4°C durante 2 horas y posteriormente fue centrifugada en a 2000 g durante 10 min, obteniéndose 1,5 ml de plasma que se congeló a -80°C en espera de ser procesado.

Posteriormente se procedió a descongelar y desproteinizar la muestra recibida empleando para ello acetonitrilo. Se unieron en la siguiente proporción: 100 µl de muestra más 200 µl de acetronitilo manteniéndolo sobre hielo picado durante 1 hora; posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4°C y se recogió el sobrenadante; tras ello se filtraron las muestras con filtros de 0,2 µm y se conservan congeladas a -70°C.

2. L.2. Procesado de muestras de plasma

Se procedió a la preparación de muestras y patrones que se combinaron con una solución compuesta por buffer, fluoróforo y estándar interno, ácido D-glutámico

en nuestro caso. El conjunto se trasladó al equipo de electroforesis capilar y se procesó siguiendo los pasos desarrollados previamente en el apartado de *procesado de muestras de tejido cerebral*.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3. A. ANÁLISIS DE DATOS RELATIVOS A PARÁMETROS MACROSCÓPICOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la aplicación informática GraphPad Prism Software® (San Diego, CA, USA). En primer lugar, se realizó un *estudio descriptivo* de los resultados obtenidos. Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes:

-*Estadística descriptiva* de las *variables cuantitativas* expresándolas mediante una medida de centralización, la media aritmética o la mediana para los datos no paramétricos, y una medida de dispersión, el error estándar de la muestra (EEM), representándose del siguiente modo, media \pm EEM.

-*Estadística descriptiva* de las *variables cualitativas*, con la obtención de porcentajes de las categorías.

-El *test de Shapiro-Wilk* para una muestra se empleó para determinar si las variables cuantitativas se ajustaban a una *distribución normal* y así cumplir los requisitos para utilizar pruebas estadísticas paramétricas, concretamente la *prueba t de Student*. Cuando el p-valor del *test de Shapiro-Wilk* es $\geq 0,05$ indica que la distribución es normal y si por el contrario el p-valor del test de Shapiro-Wilk es $< 0,05$ indica que la distribución no sigue una curva normal. Si las variables no siguen

una distribución normal se deben utilizar test estadísticos no paramétricos, concretamente en nuestro estudio, el *test de U de Mann-Whitney*.

-*Test t de Student* se empleó para *variables cuantitativas independientes*, para la comparación de dos medias. A la prueba *t de Student* se le aplicó la *prueba de Levene* para determinar igualdad de varianzas; cuando el p-valor de la prueba de Levene es $\geq 0,05$ indica que las varianzas eran iguales y si por el contrario el p-valor de la prueba de Levene es $< 0,05$ se asume que las varianzas no eran iguales. El p-valor o significación obtenida en el *test t de Student* establece si existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio, con unos niveles de significación fijados con anterioridad, concretamente al 95% si $p < 0,05$, al 99% si $p < 0,01$ y al 99,9% si $p < 0,001$. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

-Respecto al *análisis de supervivencia* se determinó que era igual para ambos grupos, al ser la supervivencia del 100%, sin precisarse por ello el cálculo de riesgos relativos ni la realización de curvas de Kaplan-Meier.

3. B. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS Y DE LOS EXPERIMENTOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Se realizaron empleando el programa de análisis estadístico GraphPad Prism Software® (San Diego, CA, USA); en el estudio vascular y los experimentos de liberación de nitritos, formación de TXB₂, 6-ceto-PGF_{1 α} y expresión de proteínas, ET-1, el análisis estadístico se realizó empleando el *test t de Student para datos no pareados*.

Los experimentos de reactividad vascular se efectuaron comparando las curvas obtenidas en ambos grupos experimentales, utilizando el *test de Análisis de la Varianza (ANOVA)*, seguido por el *test post-hoc Bonferroni*.

3. C. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL ESTUDIO DE NEUROTRANSMISORES CEREBRALES, AMINOÁCIDOS CEREBRALES Y PLASMÁTICO.

Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism Software® (San Diego, CA, USA). Se empleó la prueba *t de Student de dos colas para muestras independientes*, y previamente, el *test de Levene* para determinar la igualdad de varianzas, del mismo modo a como se describe en apartados precedentes.

Resultados

RESULTADOS

A. MODELO EXPERIMENTAL. TÉCNICA QUIRÚRGICA: COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA. RESULTADOS DE PARÁMETROS MACROSCÓPICOS

Habiendo demostrado previamente que determinadas alteraciones vasculares y neurológicas están relacionadas con la patología colestásica, y que el periodo evolutivo de la colestasis microquirúrgica en la rata, en el cual las lesiones hepáticas ya están completamente establecidas sucede alrededor del decimocuarto día de postoperatorio, se diseñó el presente estudio con la intención de analizar la posible repercusión vascular y en los neurotransmisores cerebrales.

En los siguientes apartados, se describen los resultados correspondientes a los dos grupos establecidos, uno con ratas a las cuales se realizó pseudooperación (grupo control) y otro formado por ratas sobre las que se practicó colestasis extrahepática microquirúrgica (Tabla 2).

Tabla 2: Número absoluto de individuos en cada grupo de ratas utilizadas en este trabajo

GRUPO 1 PS	n=8	Pseudooperación
GRUPO 2 CM	n=10	Colestasis microquirúrgica extrahepática

Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el análisis de los datos macroscópicos:

A. 1. Análisis de supervivencia

La supervivencia global bajo las condiciones establecidas en este estudio fue del 100%, tanto en la serie sometida a PS como en la serie en la que se practicó CM.

A. 2. Complicaciones durante el postoperatorio

Formación de úlceras crónicas (Figura 40) sobre la cicatriz de laparotomía (2 casos). Los dos casos correspondieron al grupo de ratas colestásicas.



Figura 40: Úlcera sobre la cicatriz de laparotomía secundaria a infección local en una rata del grupo CM.

A. 3. Ascitis

La producción de líquido ascítico sólo se objetiva en las ratas sometidas a CM (Tabla 3 y Figura 41).

Tabla 3: Volumen de ascitis contabilizado en mililitros y expresado como valor medio \pm EEM, en el grupo de CM.

Grupo	Ascitis (ml)
CM (n=10)	6,4 \pm 1,38

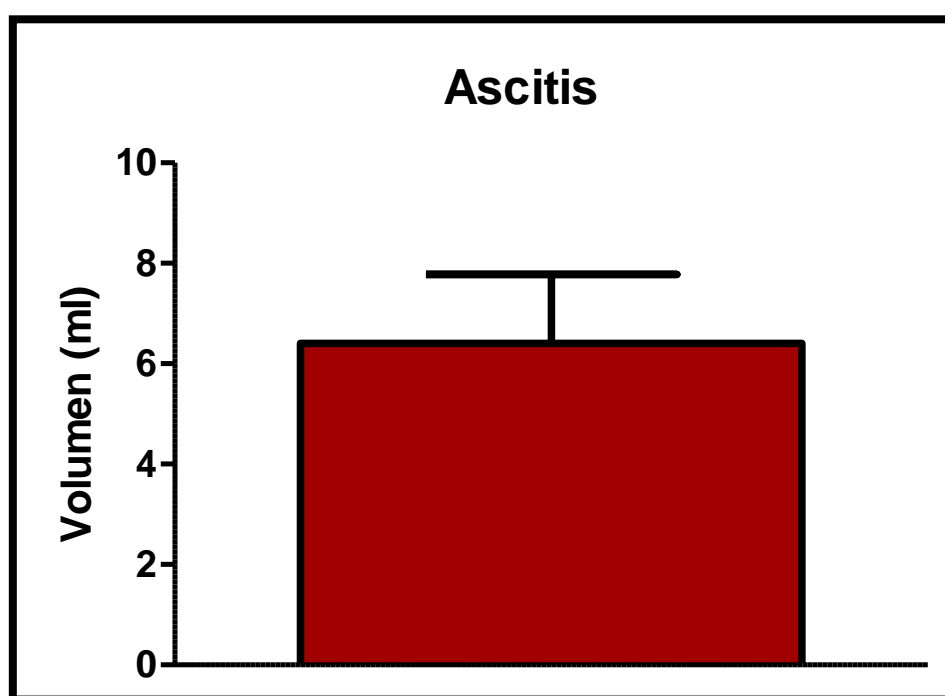


Figura 41: Representación gráfica del volumen de líquido ascítico en mililitros, en el grupo de estudio (colestasis n=10). Resultado: media \pm EEM (U de Mann-Whitney).

A. 4. Circulación colateral

Se han estudiado aquellas regiones donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa en las ratas con hipertensión portal, que son las áreas esplenorrenal (CER), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas, CPE), y pararrectal (CPR).

En el grupo de ratas sometidas a PS no se encuentra circulación colateral, pero en el grupo de animales sometidos a CM si se aprecia circulación colateral venosa (Figura 42 y Tabla 4) en todas las regiones descritas estando los cambios propios de la colestasis plenamente establecidos.

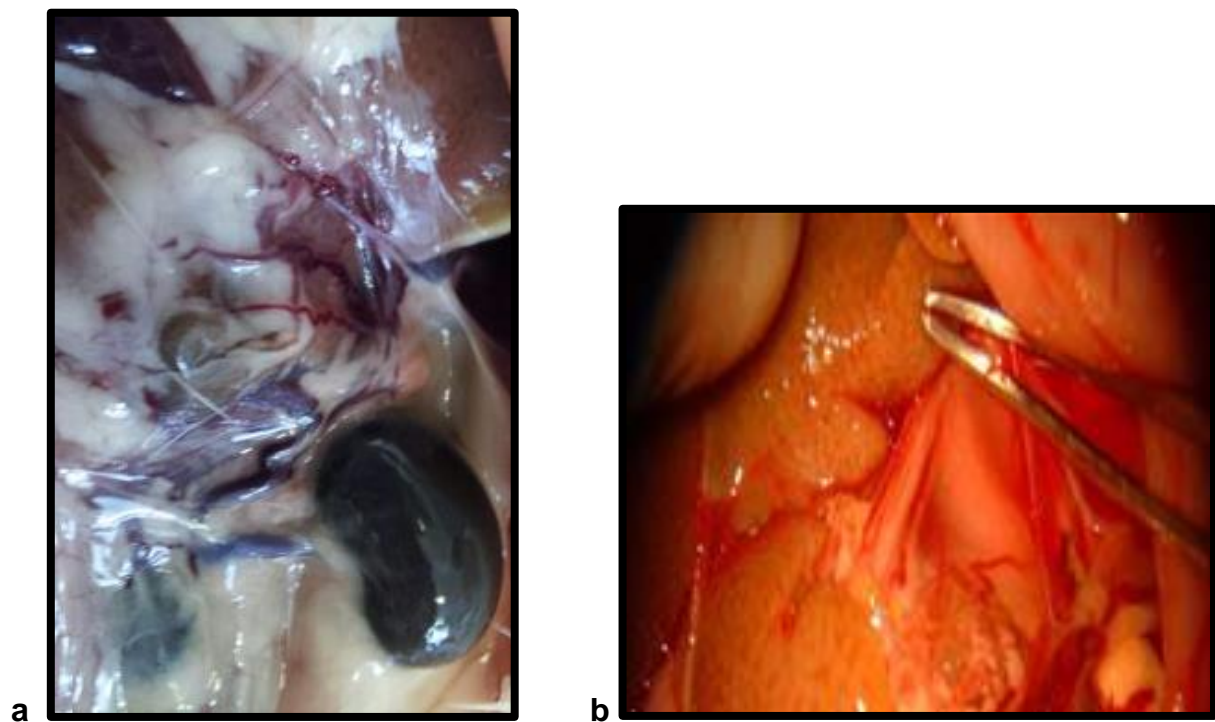


Figura 42: Circulación colateral venosa esplenorrenal (a) y paraesofágica (b)

Tabla 4: Circulación colateral venosa esplenorrenal, paraesofágica y pararrectal en animales sometidos a PS y en animales sometidos a CM

Grupo	CER (%)	CPE (%)	CPR (%)
PS (n=8)	0	0	0
CM (n=10)	100	100	100

A. 5. Vasculopatía venosa mesentérica

Al igual que en el apartado anterior no se objetivó vasculopatía venosa mesentérica en el grupo de ratas sometidas a PS, pero si se presentó en el grupo de ratas sometidas a CM y (Figura 43 y Tabla 5).

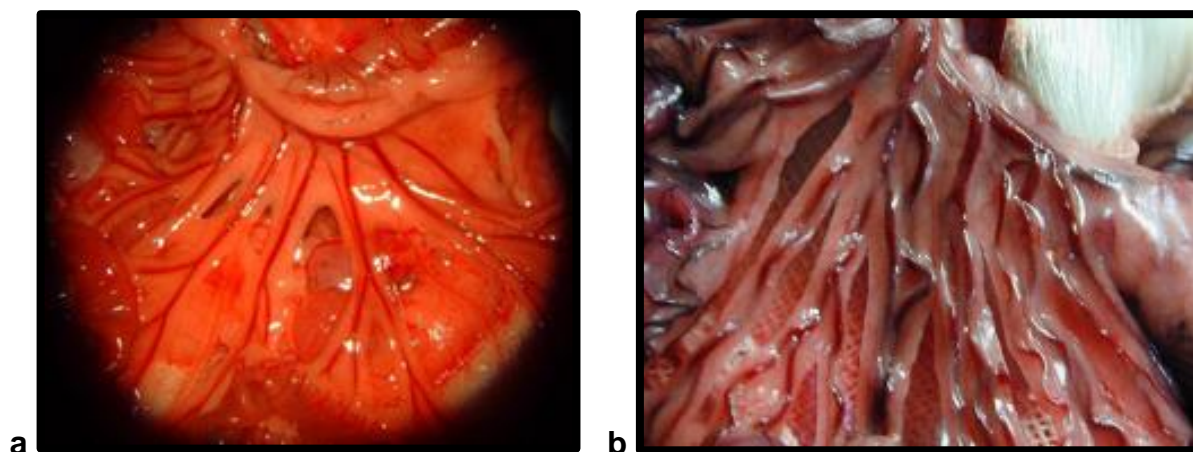


Figura 43: Vascularización venosa mesentérica fisiológica del mesenterio de la rata, correspondiente a rata PS (a). Vasculopatía venosa mesentérica de grado I, con dilatación y tortuosidad, perteneciente a rata colestásica (b).

Resultados

Tabla 5: Vascularización / vasculopatía venosa mesentérica correspondiente a ratas sometidas a PS y a ratas sometidas a CM: grado 0 (ausente), grado I (secundaria al clampaje transitorio de la vena mesentérica superior) y grado II (espontánea).

Grupo	Grado 0 (%)	Grado I (%)	Grado II (%)
PS (n=0)	100	0	0
CM (n=10)	0	0	100

A. 6. Evolución peso corporal

En la siguiente tabla (Tabla 6) se representan los resultados, en forma de media \pm EEM, correspondientes al peso corporal de las ratas para cada uno de los grupos de estudio, tanto al inicio (PCI) (Figura 44) como al final del estudio (PCF) (Figura 45), así como el incremento de peso corporal (Δ PC) (Figura 46) durante la evolución postoperatoria. Se objetivó diferencia estadísticamente significativa en relación a la variable PCF, que presenta una cifra menor en el grupo CM.

*Tabla 6: Peso corporal inicial, peso corporal final e incremento de peso corporal, cuantificado en gramos, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; ***P<0,001 grupo PS vs. grupo CM.*

Grupo	PCI (g)	PCF (g)	Δ PC (g)
PS (n=8)	368,8 \pm 8,43	412,52 \pm 9,27	43,74 \pm 5,63
CM (n=10)	294,5 \pm 2,63	315,4 \pm 15,73***	20,93 \pm 14,41

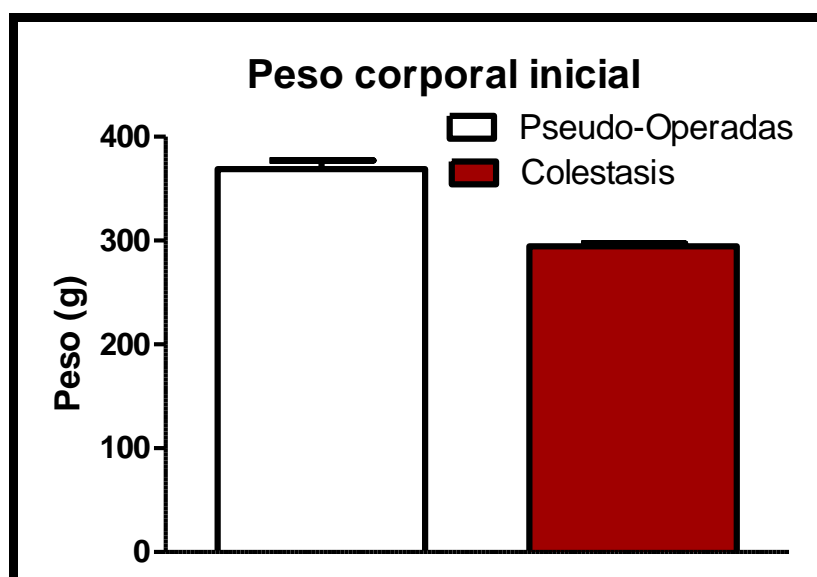


Figura 44: Representación gráfica del PCI en gramos, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; (U de Mann-Whitney).

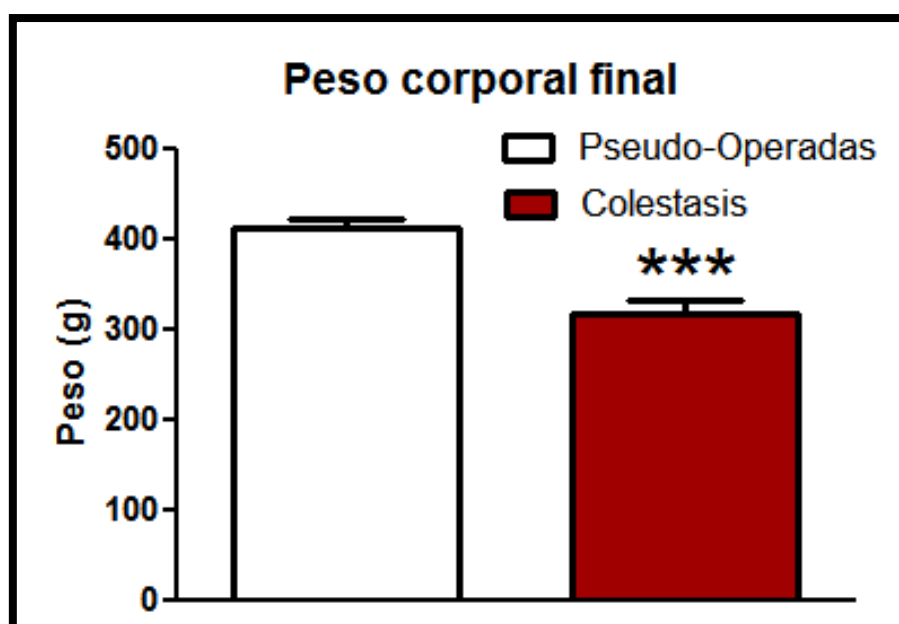


Figura 45: Representación gráfica del PCF en gramos, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; ***P<0,001 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

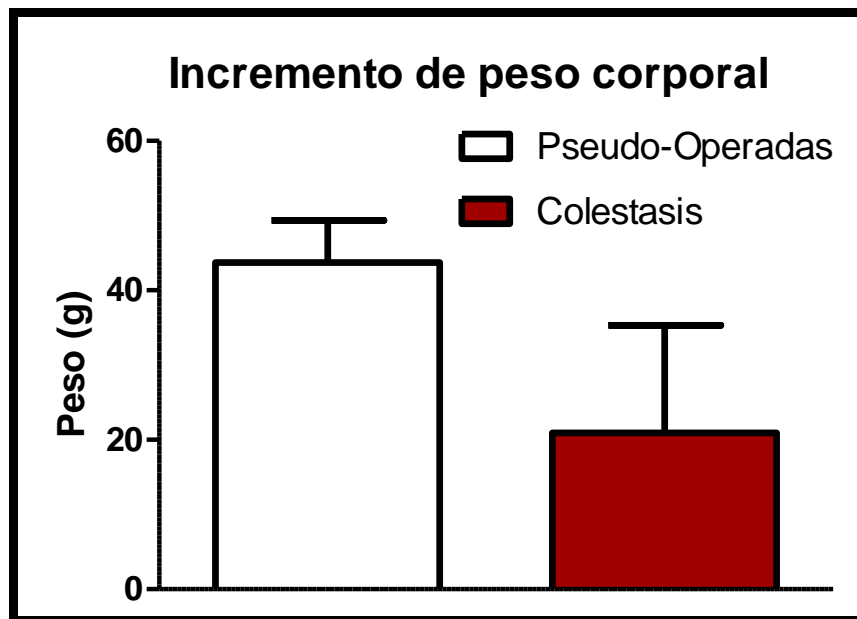


Figura 46: Representación gráfica del Δ PC en gramos, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

A. 7. Peso hepático total

En la presente tabla se representan los resultados, en forma de media \pm EEM, correspondientes al peso hepático total (PH) y al porcentaje que representa el PH en relación al PCF (Tabla 7). Se observó la existencia de un incremento estadísticamente significativo en la media de peso hepático total en el grupo intervención CM y frente a la media de peso hepático total en el grupo PS (Figura 47); así mismo, el porcentaje que representa el PH sobre el PCF fue mayor en el grupo CM, presentando diferencias estadísticamente significativas (Figura 48).

Tabla 7: Peso hepático total cuantificado en gramos y expresado como valor medio \pm EEM, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10); resultados: media \pm EEM; **P<0,01 grupo PS vs. grupo CM. Relación de peso que representa el PH en relación al PCF expresado como valor medio \pm EEM, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10); resultados: media \pm EEM; **P<0,01 grupo PS vs. grupo CM.

Grupo	Peso hígado total (g)	PH/PC * 100 (%)
PS (n=8)	12,60 \pm 0,2	3,062 \pm 0,05
CM (n=10)	18,48 \pm 1,315**	5,265 \pm 0,57**

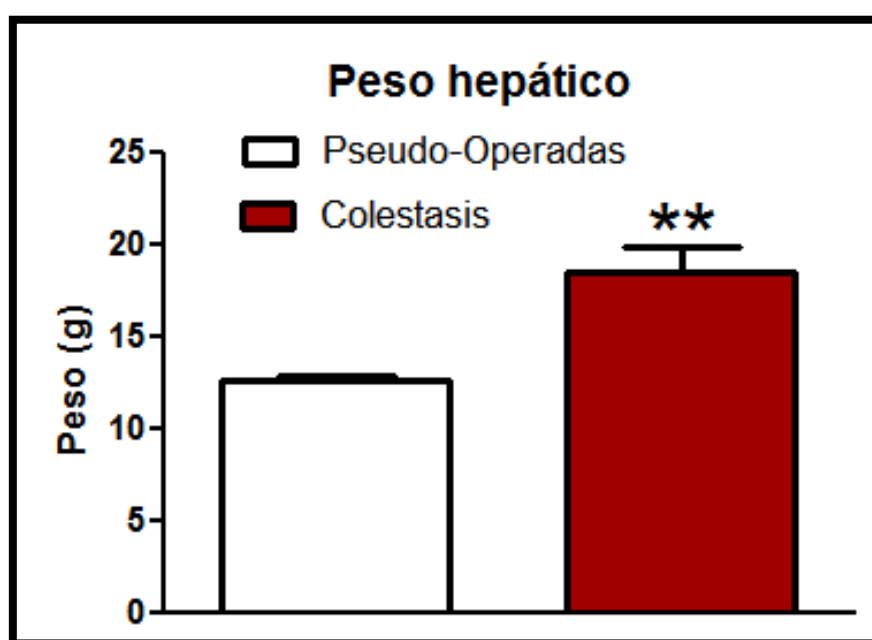


Figura 47: Representación gráfica del peso, en gramos, del hígado en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; **P<0,01 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

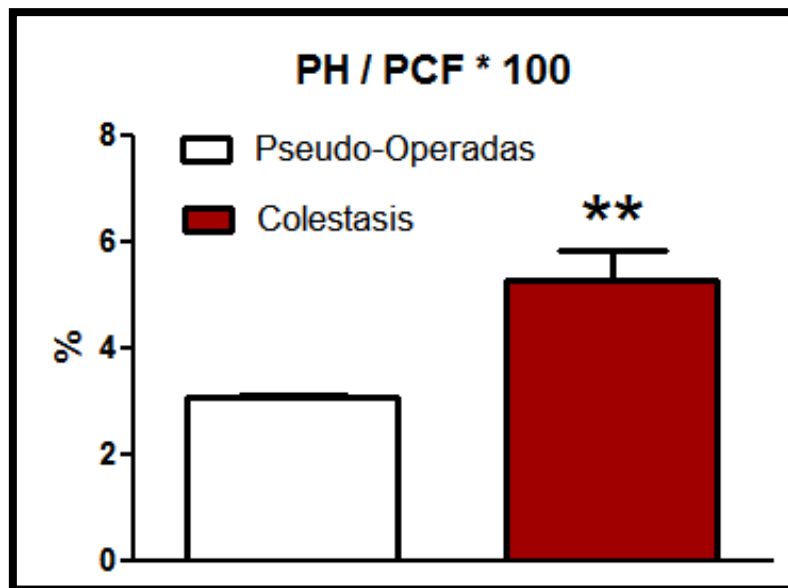


Figura 48: Representación gráfica del porcentaje de peso que representa el PH en relación al PCF en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; **P<0,01 grupo PS vs. grupo CM (U de Mann-Whitney).

A. 8. Peso de los diferentes lóbulos hepáticos

En la siguiente tabla (Tabla 8) se representan los resultados, en forma de media \pm EEM, correspondientes al peso de los diferentes lóbulos hepáticos de los animales de experimentación, para cada uno de los grupos de trabajo. A saber, lóbulo medio (LM) (Figura 49), lóbulo lateral derecho (LLD) (Figura 50), lóbulo lateral izquierdo (LLI) (Figura 51) y lóbulo caudado (LC) (Figura 52). Se encuentran incrementos estadísticamente significativos en el peso del LM y del LLI en el grupo de CM en comparación con el grupo PS.

Tabla 8: Peso del lóbulo hepático medio, del lóbulo hepático lateral derecho, del lóbulo hepático lateral izquierdo y del lóbulo hepático caudado, cuantificado en gramos, en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10;). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM.

Grupo	LM (g)	LLD (g)	LLI (g)	LC (g)
PS (n=8)	1,51 \pm 0,26	4,02 \pm 0,08	4,49 \pm 0,09	2,58 \pm 0,32
CM (n=10)	4,26 \pm 0,79*	5,16 \pm 0,59	6,26 \pm 0,41*	2,81 \pm 0,41

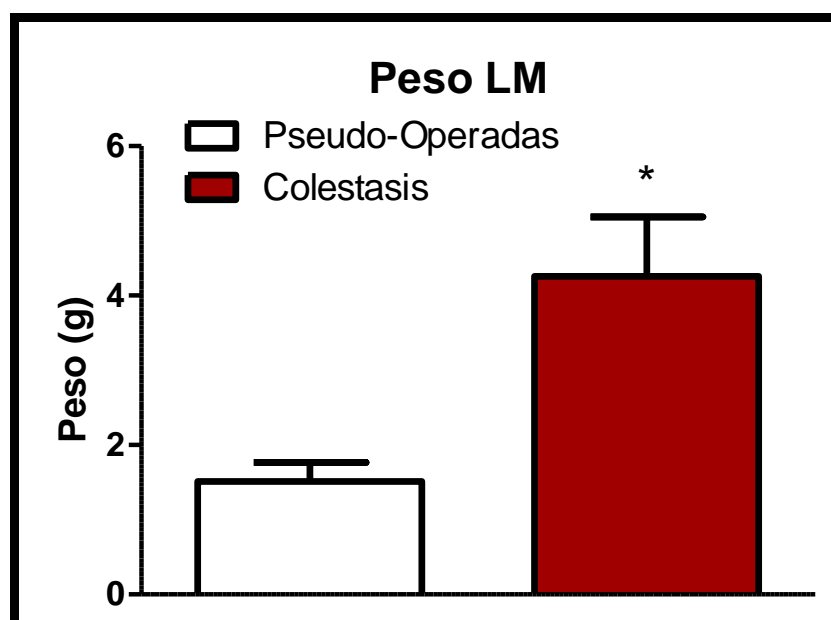


Figura 49: Representación gráfica del peso en gramos del lóbulo hepático medio en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

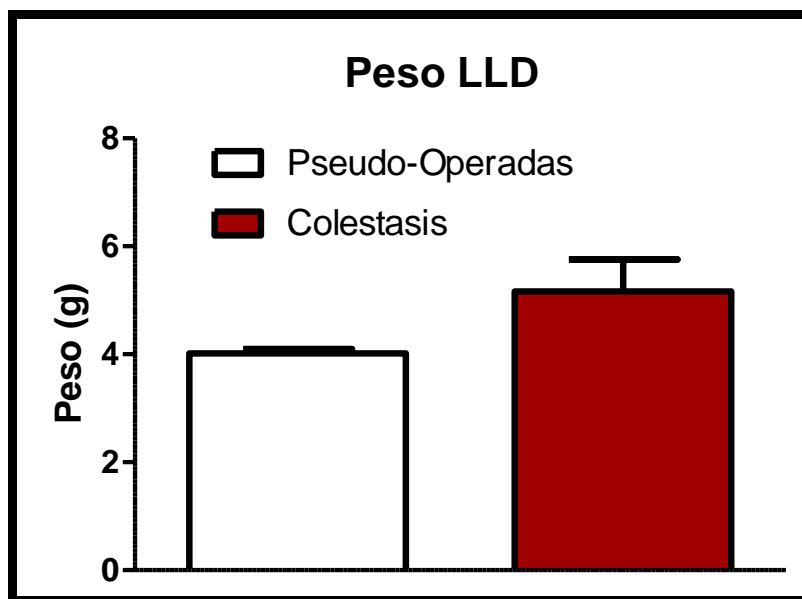


Figura 50: Representación gráfica del peso en gramos del lóbulo hepático lateral derecho en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

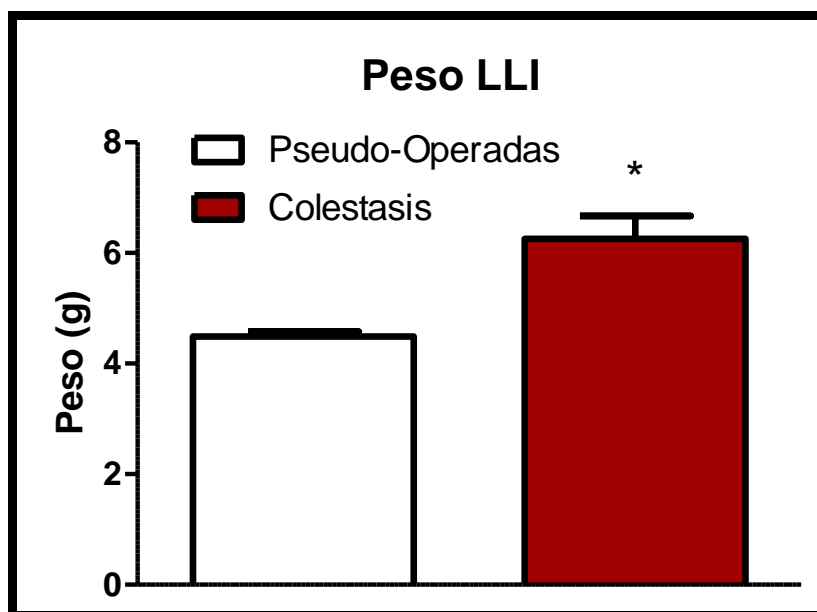


Figura 51: Representación gráfica del peso en gramos del lóbulo hepático lateral izquierdo en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10;). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

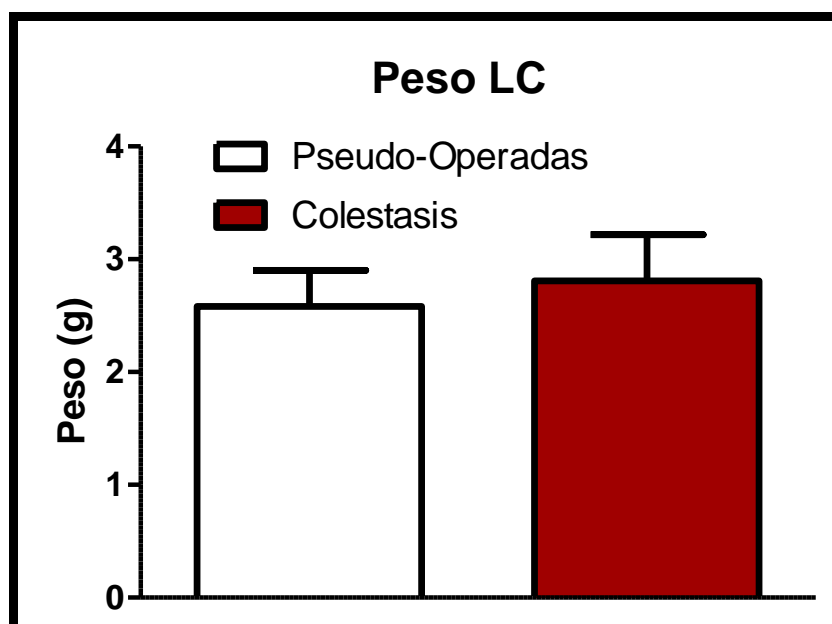


Figura 52: Representación gráfica del peso en gramos del lóbulo hepático caudado en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (U de Mann-Whitney).

B. RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE FACTORES VASOACTIVOS Y DE CONTRACTILIDAD NIVEL VASCULAR, EN ARTERIA CEREBRAL MEDIA

B. 1. Liberación de nitritos

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la liberación de nitritos inducida por BK en arterias cerebrales de los animales sometidos a CM (Figura 53).

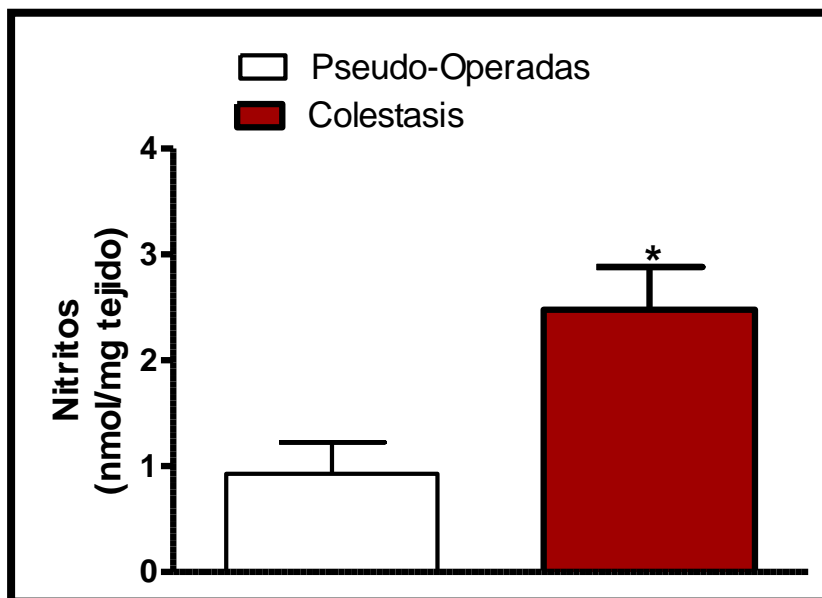


Figura 53: Liberación de nitritos (nmol/mg tejido) en arterias cerebrales en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 2. Análisis de la expresión de las distintas isoformas de NOS

B. 2.A. Análisis de la expresión de iNOS total

La expresión de iNOS en arterias cerebrales en el grupo CM aumentó significativamente (Figura 54).

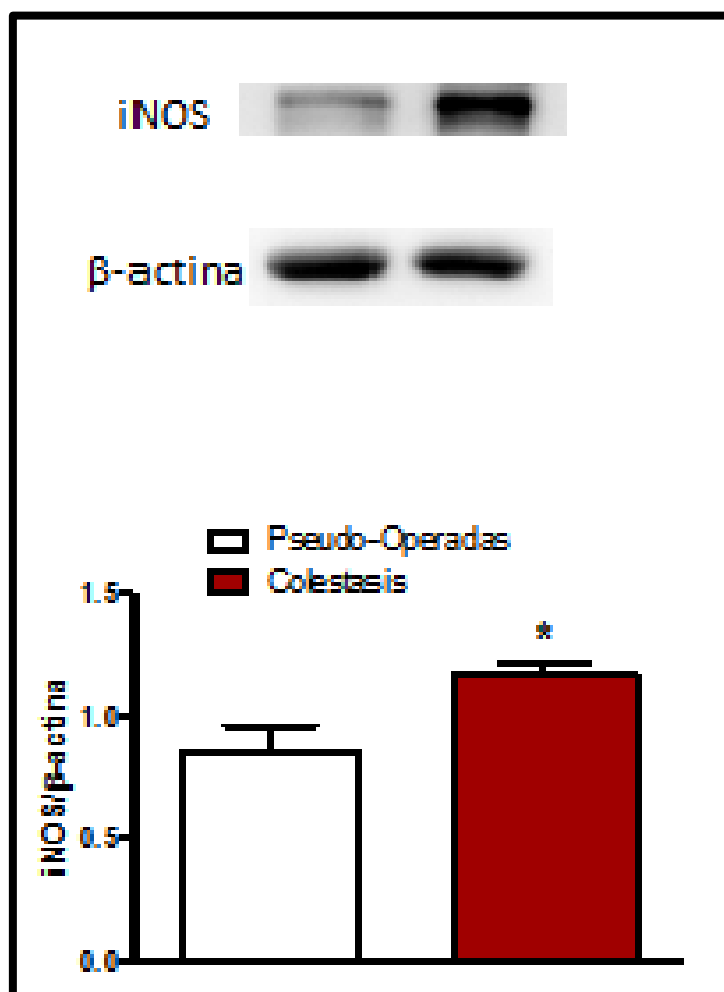


Figura 54: Western blot representativo de la expresión de iNOS en arterias cerebrales de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. El panel superior muestra el análisis densitométrico de la expresión de la enzima. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como la relación entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

Resultados

B. 2.B. Análisis de la expresión de eNOS total y fosforilada

Se encontró un aumento significativo en la expresión de eNOS total y eNOS fosforilada en arterias cerebrales en el grupo CM (Figura 55).

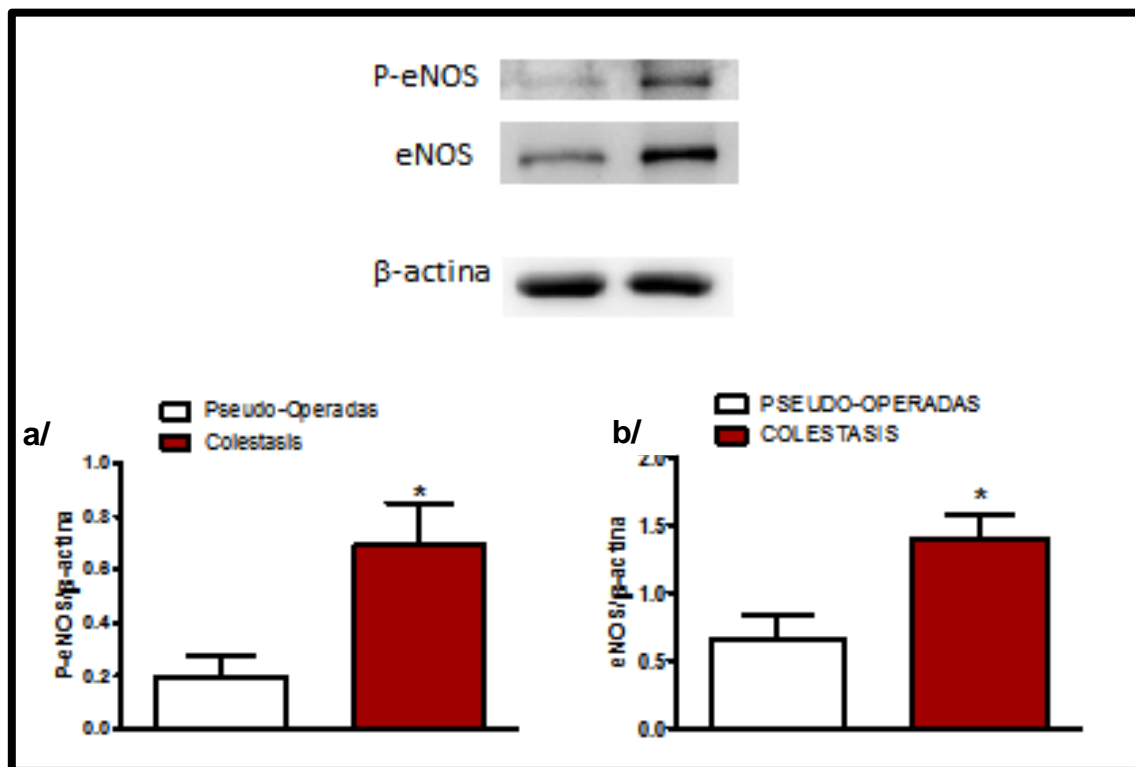


Figura 55: Western blot representativos de la expresión de P-eNOS (a) y eNOS (b) en arterias cerebrales de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. Los paneles superiores muestran los análisis densitométricos de la expresión de las distintas formas enzimáticas. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como la razón entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 2.C. Análisis de la expresión de nNOS total y fosforilada

La expresión de nNOS y de nNOS fosforilada fue similar en ambos grupos experimentales (Figura 56).

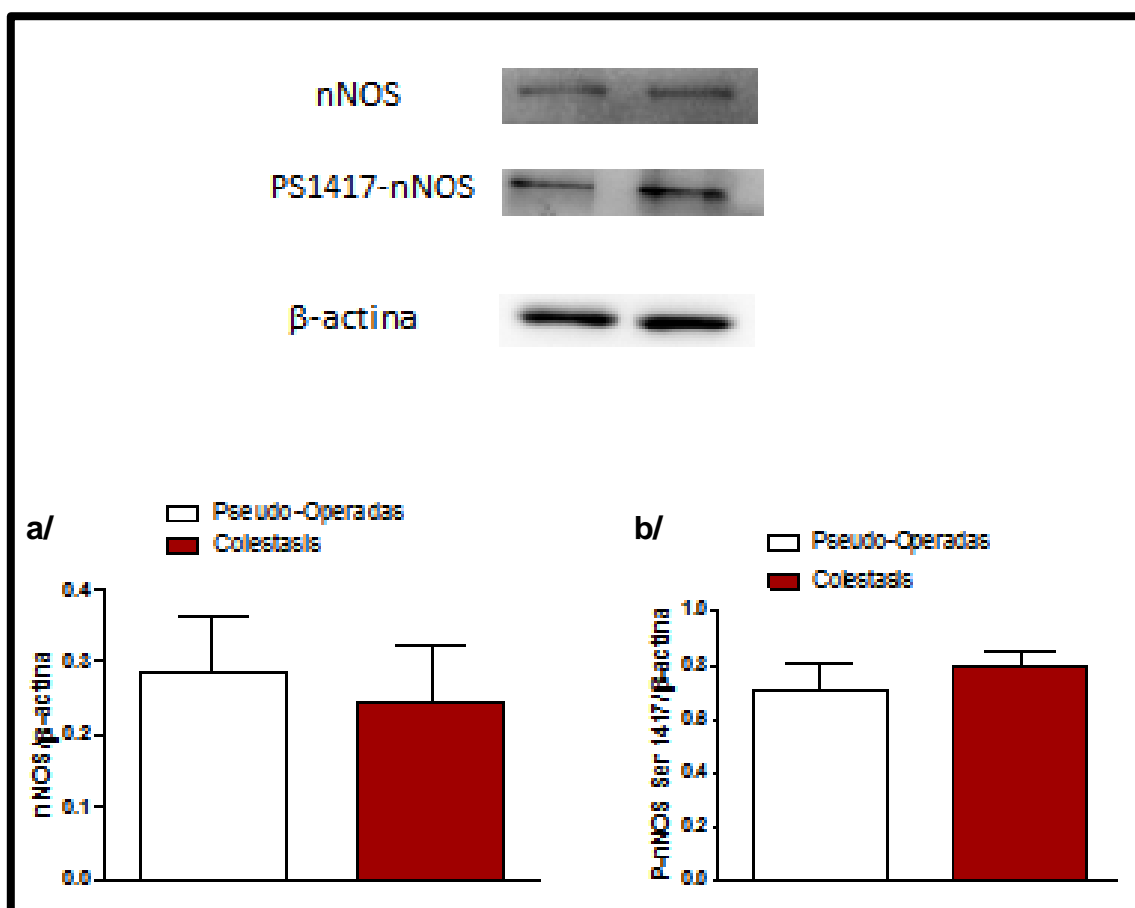


Figura 56: Western blot representativos de la expresión de nNOS (a) y P-nNOS (b) en arteria cerebral de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. Los paneles superiores muestran los análisis densitométricos de la expresión de las distintas formas enzimáticas. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 3. Producción de prostanoïdes:

B. 3.A. Liberación de 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$

La liberación de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ aumentó significativamente en el grupo CM (Figura 57).

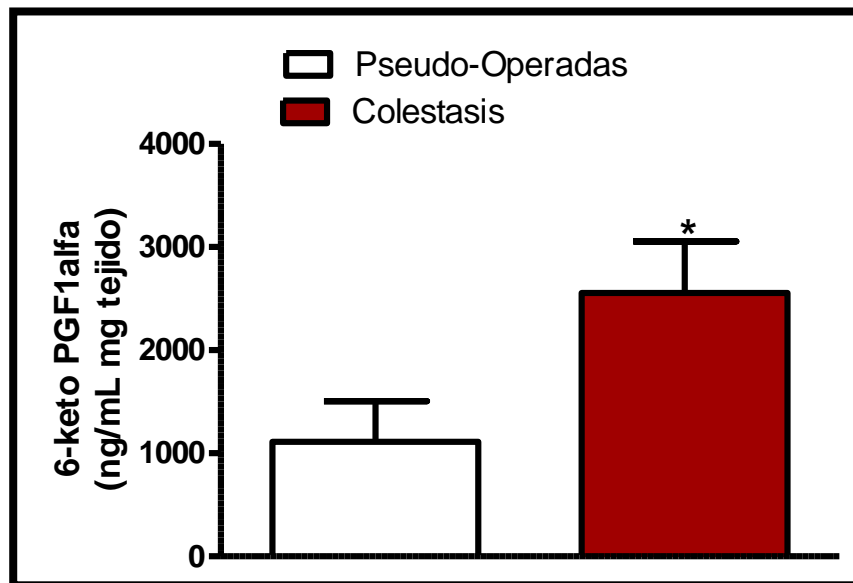


Figura 57: Liberación de 6 ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (ng/mL mg tejido) en arterias cerebrales en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 3.B. Liberación de Tromboxano B₂

No se observaron diferencias significativas para la liberación de TXB₂ (Figura 58).

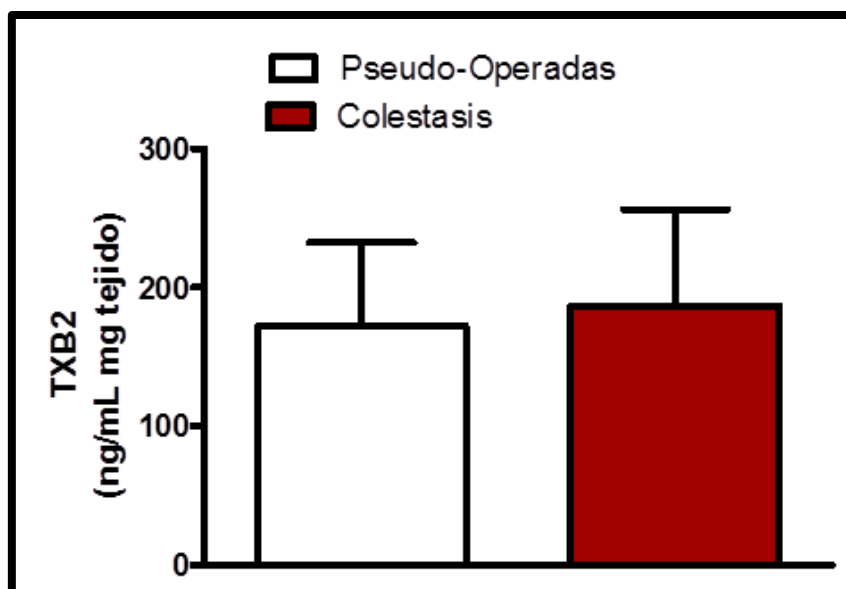


Figura 58: Liberación de TXB₂ (ng/mL mg tejido) en arterias cerebrales en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 4. Análisis de la expresión de las isoformas de ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2)

B. 4.A. Análisis de la expresión de COX-1

En la expresión de COX-1 en arterias cerebrales no hubo diferencias entre ambos grupos experimentales (Figura 59).

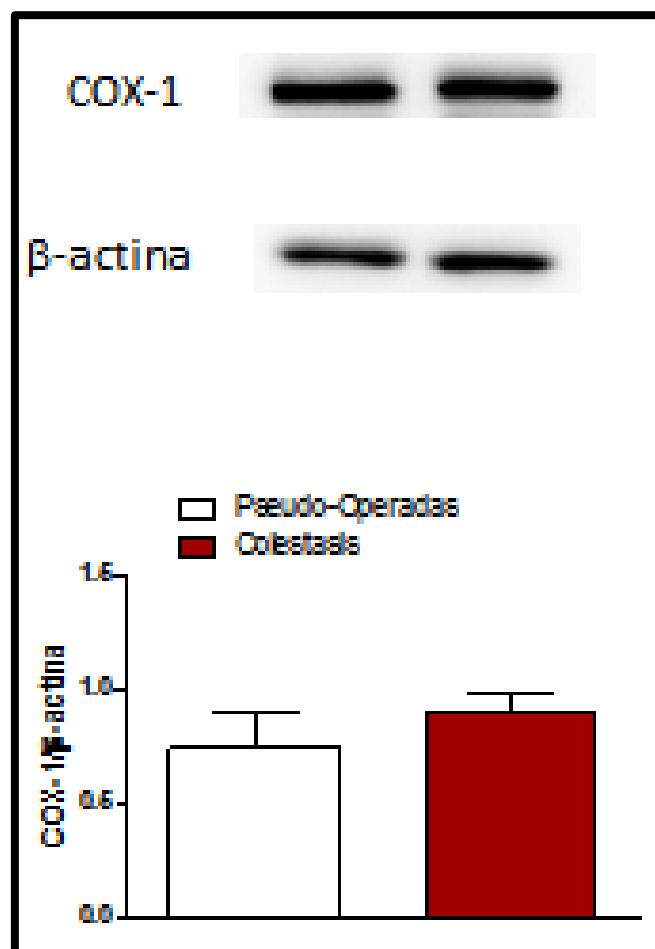


Figura 59: Western blot representativo de la expresión de COX-1 en arterias cerebrales de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. El panel superior muestra el análisis densitométrico de la expresión de la enzima. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como la razón entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 4.B. Análisis de la expresión de COX-2

Observamos un aumento significativo de COX-2 en el grupo de CM (Figura 60).

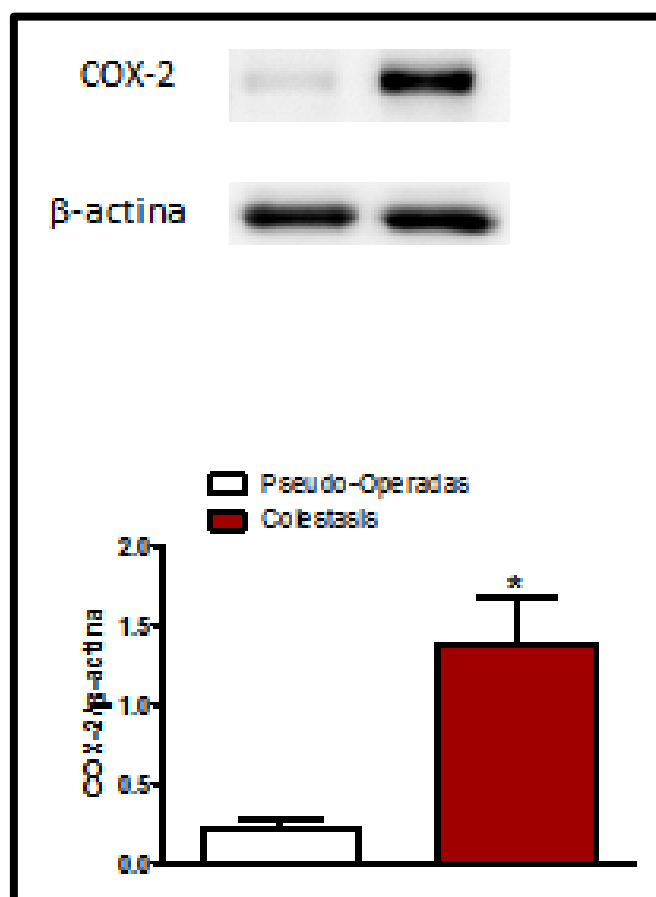


Figura 60: Western blot representativo de la expresión de COX-2 en arterias cerebrales de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. El panel superior muestra el análisis densitométrico de la expresión de la enzima. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 5. Expresión de Prostaglandina I₂ Sintasa (PGI₂S) y Tromboxano A₂ Sintasa (TXA₂S)

B. 5.A. Análisis de la expresión de PGI₂S

No encontramos diferencias en PGI₂S en las condiciones experimentales descritas (Figura 61).

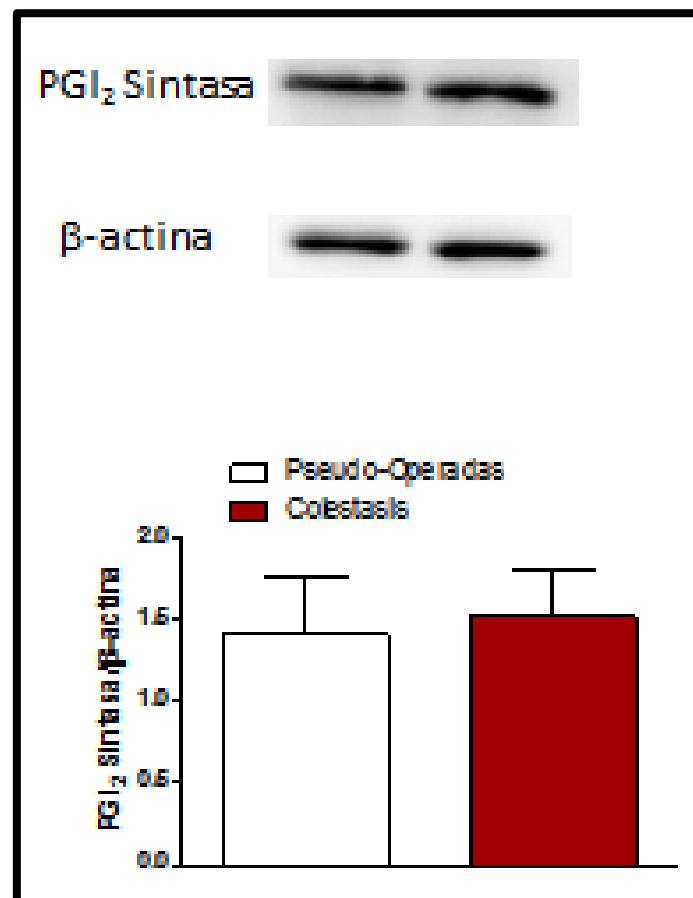


Figura 61: Western blot representativo de la expresión de PGI₂S en arteria cerebral de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. El panel superior muestra los análisis densitométricos de la expresión de la enzima. Los resultados (media ± EEM) se expresaron como la relación entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β-actina. *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 5.B. Análisis de la expresión de TXA_2S

La expresión de TXA_2S fue similar en ambos grupos experimentales (Figura 62).

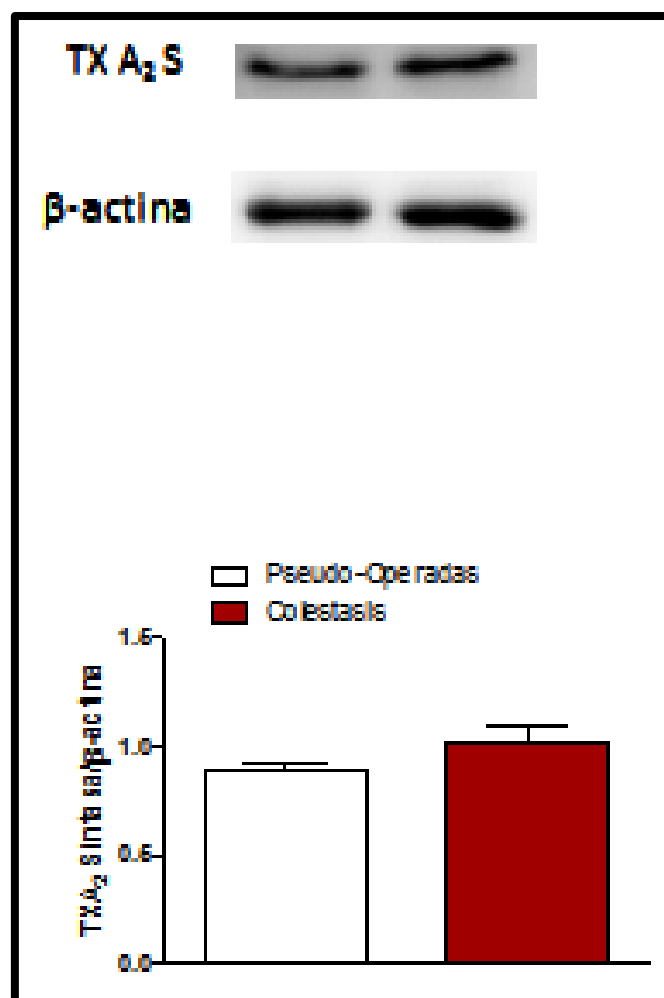


Figura 62: Western blot representativo de la expresión de TXA_2S en arteria cerebral de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. El panel superior muestra el análisis densitométrico de la expresión de la enzima. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como la razón entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 6. Liberación de Endotelina-1 (ET-1)

La liberación de ET-1 inducida por BK fue significativamente menor en los animales sometidos a CM (Figura 63).

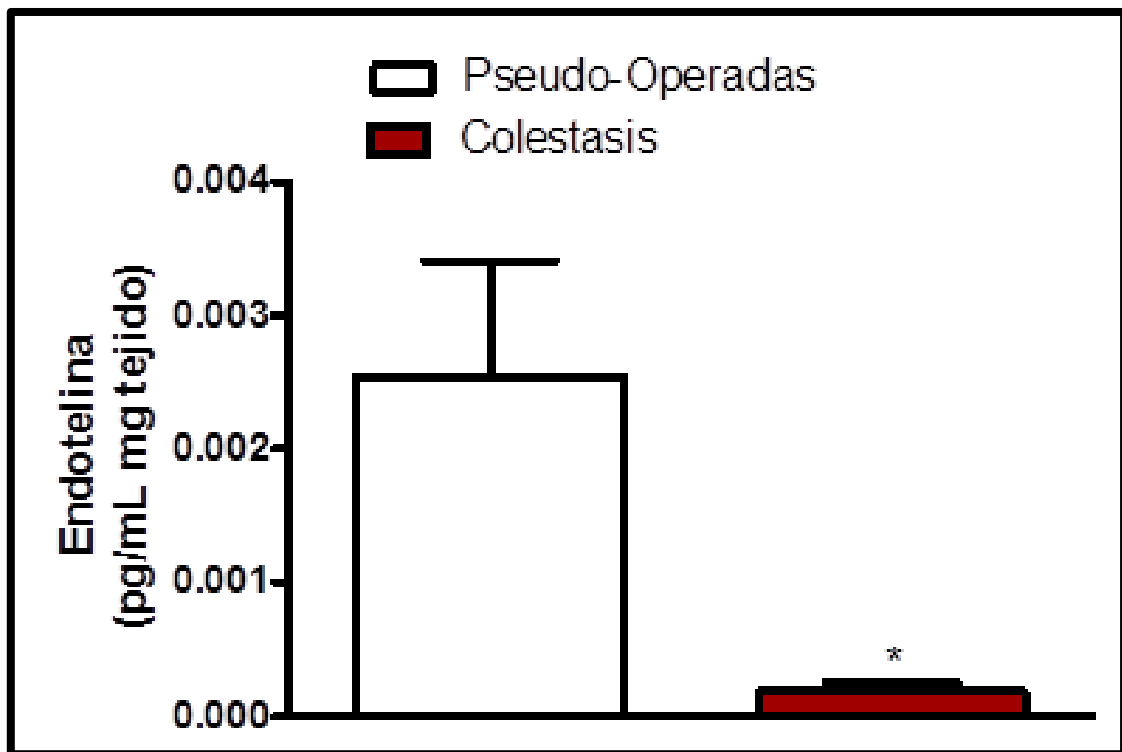


Figura 63: Liberación de ET-1 (pg/mL mg tejido) en arterias cerebrales en ambos grupos de estudio (pseudo-operación n=8; colestasis n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 7. Expresión de enzima convertora de endotelina 1

La expresión de ECE 1 disminuyó significativamente en los animales sometidos a CM (Figura 64).

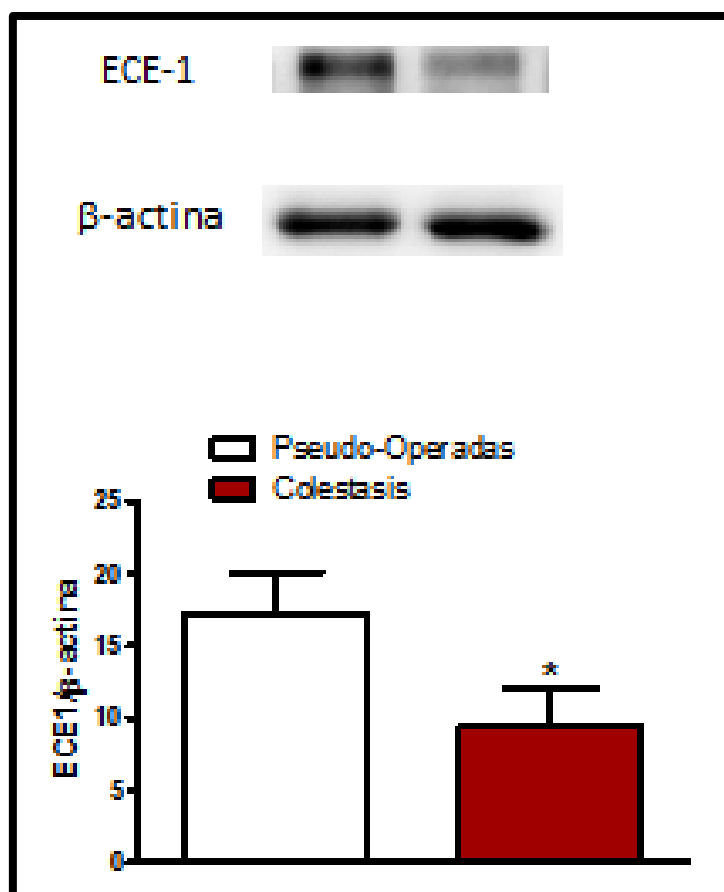


Figura 64: Western blot representativo de la expresión de ECE1 en arterias cerebrales de ratas PS y sometidas a CM. La figura es representativa de preparaciones de ocho animales distintos de cada grupo. El panel inferior muestra el análisis densitométrico de la expresión de la enzima. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la enzima y la obtenida para la β -actina. * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 8. Respuesta vasoconstrictora a KCl

La vasoconstricción inducida por 120 mmol/L K^+ -KHS fue similar en ambos grupos experimentales (pseudo-operación: $2,295 \pm 0,73$ mN/mm; colestasis: $2,140 \pm 0,47$ mN/mm, $P > 0,05$) (Figura 65).

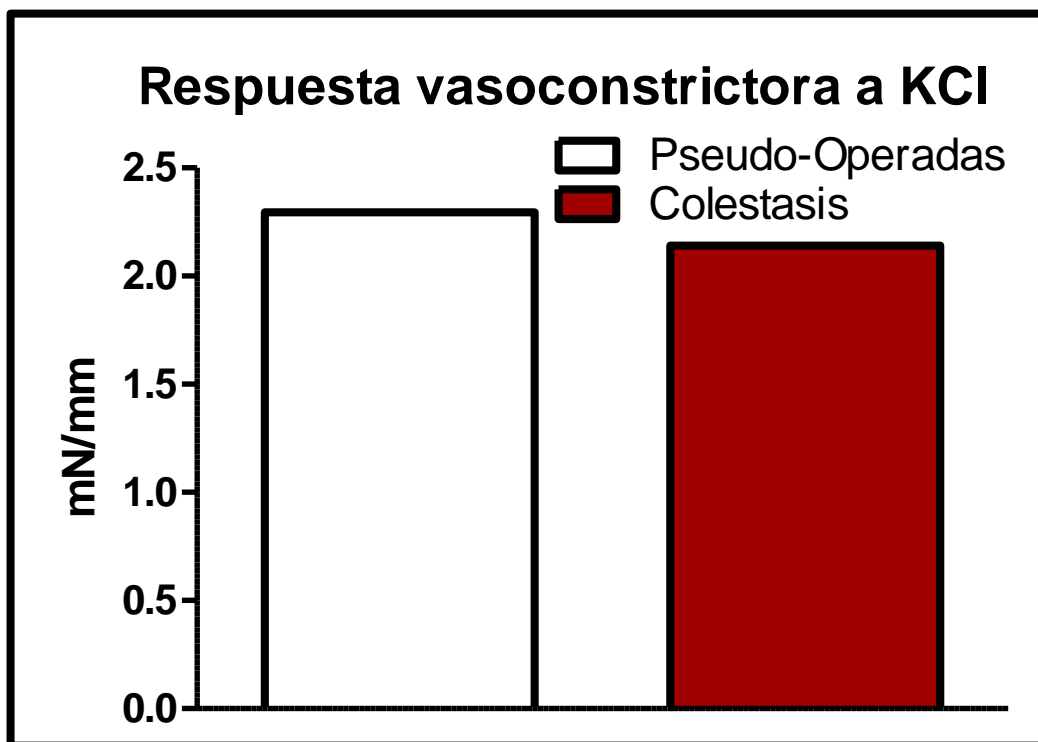


Figura 65: Respuesta vasoconstrictora a KCl en ambos grupos de estudio. Los resultados obtenidos fueron: PS $2,295 \pm 0,73$ mN/mm; CM $2,140 \pm 0,47$ mN/mm (media \pm EEM). * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

B. 9. Relajación a bradiquinina dependiente de endotelio

La aplicación de BK en segmentos de ACM precontraídos con 5-HT produjo una respuesta dependiente de concentración en anillos de ambos grupos experimentales. Esta respuesta fue mayor en arterias de las ratas sometidas a CM (Figura 66).

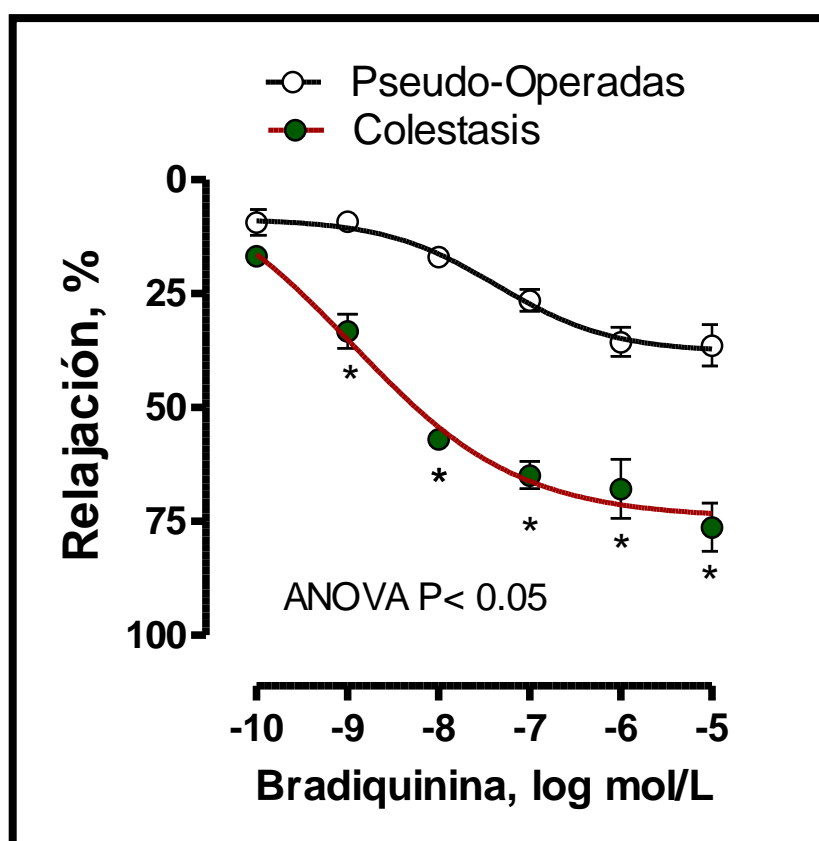


Figura 66: Respuesta vasodilatadora a bradiquinina en ambos grupos de estudio. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la contracción previa inducida por serotonina; n=8-10 animales por grupo experimental. *P<0,05 (test Bonferroni post-hoc).

C. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS/NEUROTRANSMISORES EN TEJIDO CEREBRAL Y PLASMA

C. 1. Resultados determinación de aminoácidos en núcleos encefálicos:

C. 1.A. Inspección macroscópica de cerebro

Tras la descongelación de los cerebros, en la inspección macroscópica en fresco de las muestras provenientes de ratas sometidas a CM se aprecia un tinte icterico que no está presente en las ratas sometidas a PS (Figura 67).

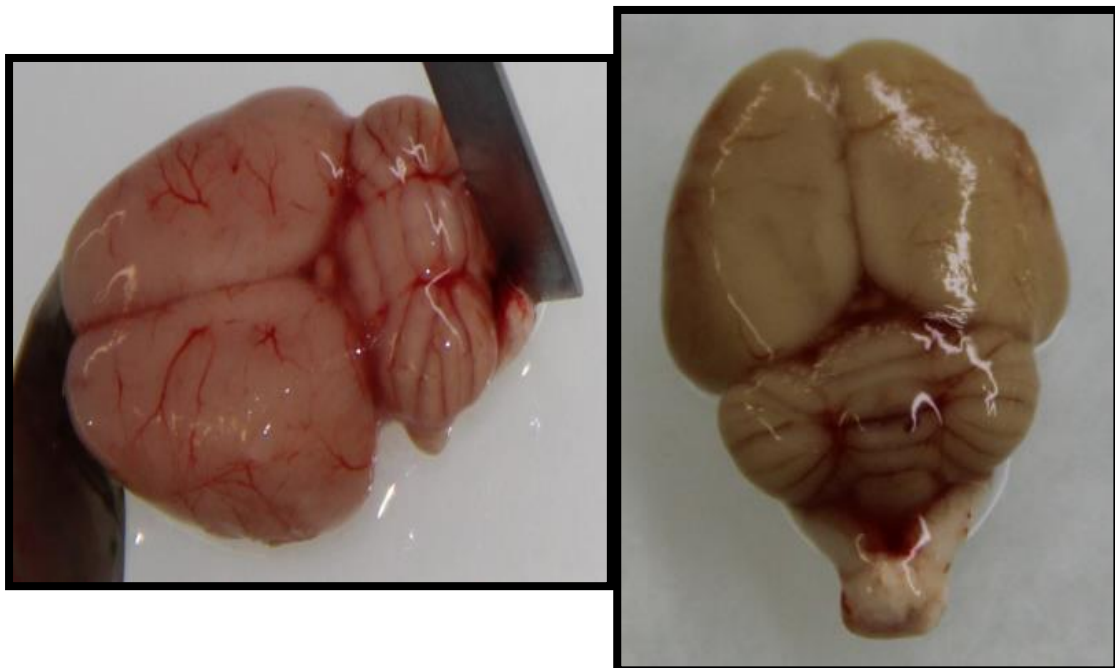


Figura 67: La imagen de la derecha corresponde a un cerebro de rata PS y la imagen de la izquierda pertenece a un cerebro de rata CM.

C. 1.B. Cerebelo:

Los aa analizados a este nivel fueron: Ácido L-Glutámico (L-Glutamato), Ácido L-Aspártico (L-Aspartato), Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina, L-Arginina y GABA (Figura 67 y Tabla 9). Los resultados reflejan un aumento de GABA en el grupo sometido a CM frente al grupo sometido a PS, presentando diferencias estadísticamente significativas ($t_{16}= 2,386$ $p < 0,05$) (Figura 68 y Tabla 9)

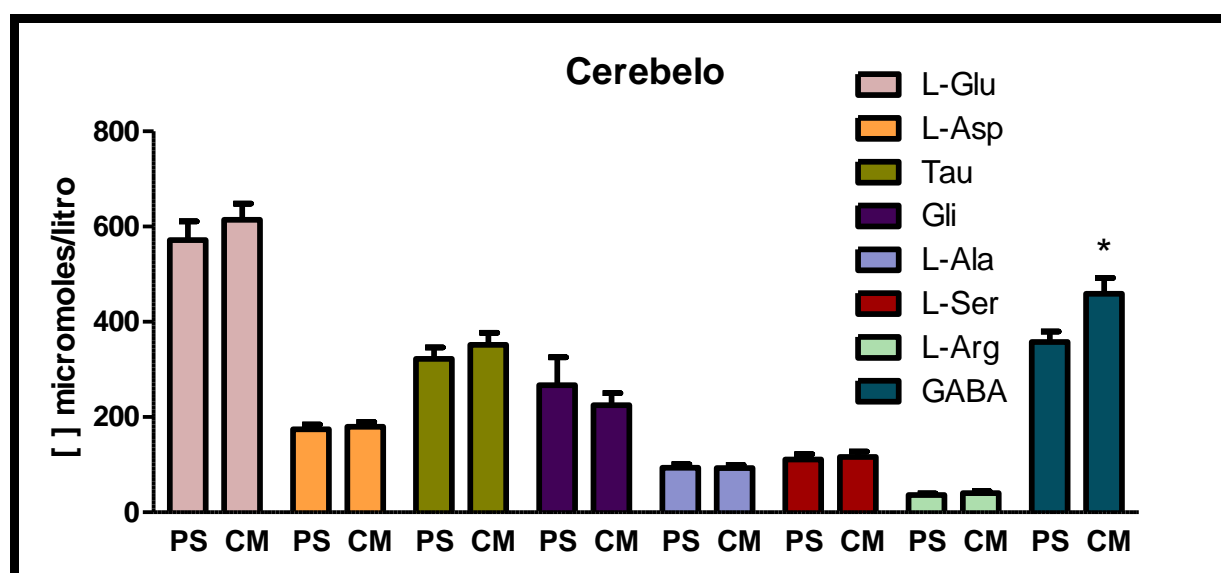


Figura 68: Determinación de las concentraciones (micromoles/litro) de los diferentes aminoácidos cuantificados en cerebelo (pseudo-operación, PS, n=8; colestasis, CM, n=10). Resultados: media \pm EEM; * $P < 0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

Resultados

Tabla 9: Resultados test *t* de Student de muestras independientes para los aminoácidos analizados en cerebelo.

Cerebelo	t_{gl}	p
L-Glutamato	$t_{16}= 0,818$	0,425
L-Aspartato	$t_{16}= 0,388$	0,703
Taurina	$t_{16}= 0,813$	0,428
Glicina	$t_{9,698}= 0,663$	0,523
L-Alanina	$t_{16}= 0,060$	0,953
L-Serina	$t_{16}= 0,358$	0,725
L-Arginina	$t_{16}= 0,802$	0,434
GABA	$t_{16}= 2,386$	<0,05

C. 1.C. Núcleo Estriado Dorsal

Los aa analizados a este nivel fueron: Ácido L-Glutámico (L-Glutamato), Ácido L-Aspártico (L-Aspartato), Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina, L-Arginina y GABA (Figura 69 y Tabla 10). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio. En el análisis de GABA observamos un descenso en el grupo CM frente al grupo PS, que si bien no alcanza significación estadística puede constituir una tendencia ($t_{15}= 1,873$ $p= 0,081$).

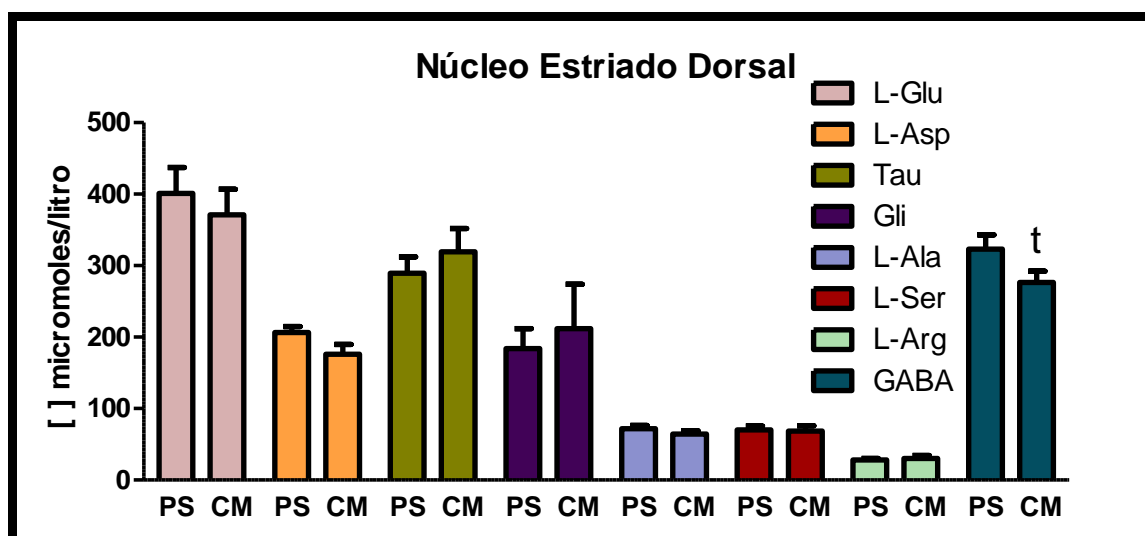


Figura 69: Determinación de las concentraciones (micromoles/litro) de los distintos aminoácidos cuantificados en núcleo estriado dorsal (pseudo-operación, PS, n=7; colestasis, CM, n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM; t.-> p=0,08 (t de Student).

Tabla 10: Resultados test t de Student de muestras independientes para los aminoácidos analizados en núcleo estriado dorsal

N. Estriado Dorsal	t _{gl}	p
L-Glutamato	t ₁₅ = 0,574	0,575
L-Aspartato	t ₁₅ = 1,711	0,108
Taurina	t ₁₅ = 0,687	0,502
Glicina	t ₁₅ = 0,356	0,727
L-Alanina	t ₁₅ = 1,088	0,294
L-Serina	t ₁₅ = 0,165	0,871
L-Arginina	t ₁₅ = 0,379	0,71
GABA	t ₁₅ = 1,873	0,081

Resultados

C. 1.D. Hipotálamo

Los aa analizados a este nivel fueron: Ácido L-Glutámico (L-Glutamato), Ácido L-Aspártico (L-Aspartato), Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina, L-Arginina y GABA (Figura 70 y Tabla 11). En los datos obtenidos no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de trabajo para ninguno de los aminoácidos determinados.

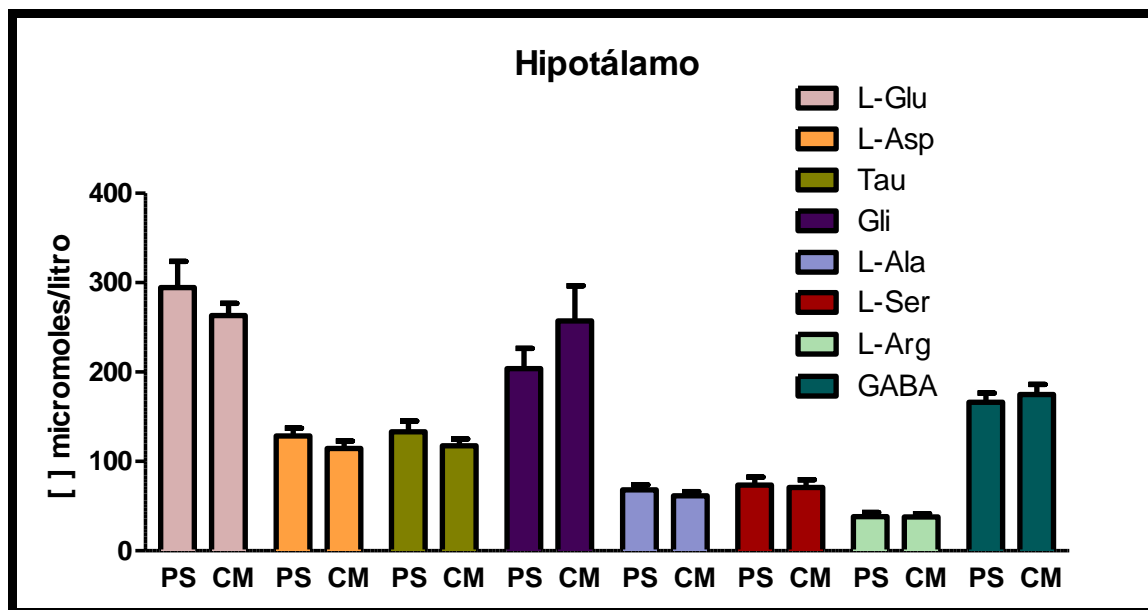


Figura 70: Determinación de las concentraciones (micromoles/litro) de los distintos aminoácidos cuantificados en núcleo estriado dorsal (pseudo-operación, PS, n=8; colestasis, CM, n=10). Para el análisis de glicina y arginina se empleó n=7 en el grupo PS, debido a resultados artefactuales. Para el análisis de GABA se empleó n=6 para el grupo PS y n=9 para el grupo CM, debido a resultados artefactuales. Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM; t.-> p=0,08 (t de Student).

Tabla 11: Resultados test t de Student de muestras independientes para los aminoácidos analizados en hipotálamo.

Hipotálamo	t_{gl}	p
L-Glutamato	t ₁₆ = 1,041	0,313
L-Aspartato	t ₁₆ = 1,169	0,259
Taurina	t ₁₆ = 1,152	0,266
Glicina	t _{13,715} = 1,171	0,261
L-Alanina	t ₁₆ = 0,966	0,348
L-Serina	t ₁₆ = 0,197	0,846
L-Arginina	t ₁₅ = 0,76	0,94
GABA	t ₁₃ = 0,556	0,587

C. 2. Resultados determinación de aminoácidos en plasma

A nivel macroscópico se objetivan diferencias en el color de la muestra presentando la procedente de ratas sometidas a colestasis extrahepática microquirúrgica un tinte icterico llamativo (Figura 71).



Figura 71: Imagen que muestra la diferencia macroscópica de color en el plasma obtenido del grupo de ratas sometidas CM, tinte icterico del eppendorf de la derecha, frente al grupo de ratas PS.

Resultados

Los aa analizados a este nivel fueron: Ácido L-Glutámico (l-Glutamato), Ácido L-Aspártico (L-Aspartato), Taurina, Glicina, L-Alanina, L-Serina y L-Arginina (Figura 72 y Tabla 12). Los resultados reflejan diferencias estadísticamente significativas presentando un aumento tanto de Glicina ($t_{15}= 2,362$ $p< 0,05$), como de l-Alanina ($t_{15}= 4,927$ $p< 0,001$) y de l-Serina ($t_{15}= 4,140$ $p< 0,01$) en el grupo sometido a CM frente al grupo sometido a PS. Así mismo, el aminoácido L-Glutamato ($t_{15}= 4,168$ $p< 0,05$) refleja un descenso en el grupo CM frente al grupo PS, presentando también diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, el aminoácido L-Arginina presenta un aumento en el grupo de CM frente al grupo de PS, y pese a que no alcanza significación estadística, si puede constituir una tendencia ($t_{15}= 1,988$ $p=0,065$).

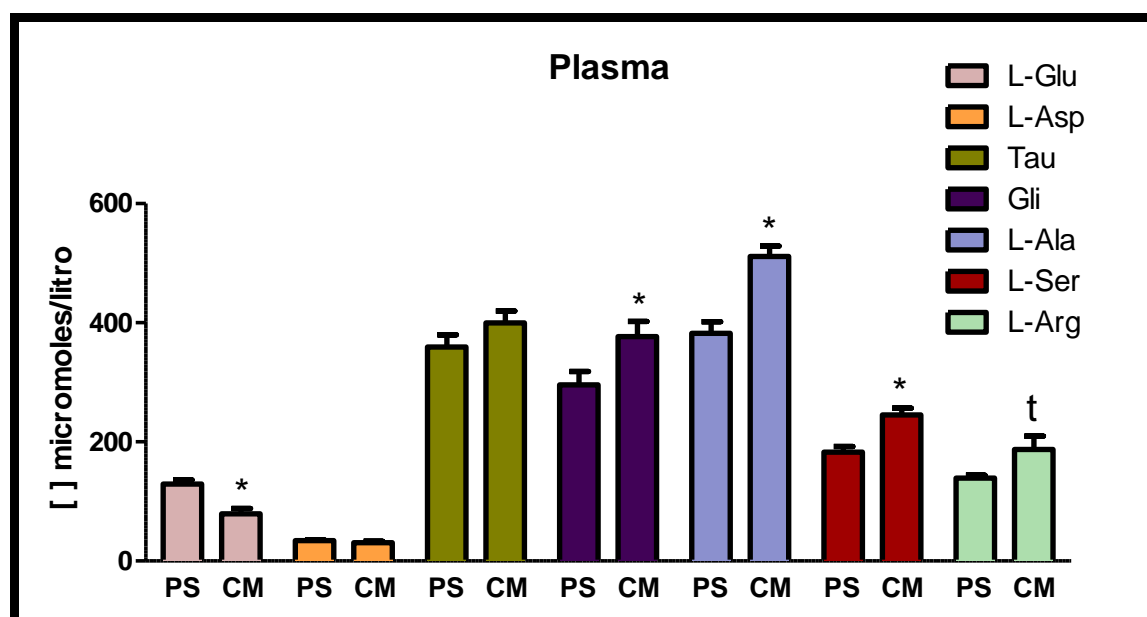


Figura 72: Determinación de las concentraciones (micromoles/litro) de los diferentes aminoácidos cuantificadas en plasma (pseudo-operación, PS, n=8; colestasis, CM, n=9). Resultados: media \pm EEM; * $P<0,05$ grupo PS vs. grupo CM; t- \rightarrow $p= 0,065$ (t de Student).

Tabla 12: Resultados test *t* de Student de muestras independientes para los aminoácidos analizados en plasma.

Plasma	t_{gl}	p
L-Glutamato	$t_{15} = 4,168$	$<0,05$
L-Aspartato	$t_{15} = 1,080$	0,297
Taurina	$t_{15} = 1,416$	0,177
Glicina	$t_{15} = 2,362$	$<0,05$
L-Alanina	$t_{15} = 4,927$	$<0,001$
L-Serina	$t_{15} = 4,140$	$<0,01$
L-Arginina	$t_{15} = 1,988$	0,065

C. 3. Relaciones entre aminoácidos. Ratios

Se establecieron las siguientes relaciones o *ratios* entre aminoácidos: L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina, en cerebelo, núcleo estriado dorsal e hipotálamo. En plasma se analizaron los ratios mencionados y también el ratio L-Glutamato/l-Alanina.

Resultados

C. 3.A. Ratios Cerebelo

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental sometido a CM frente al grupo experimental sometido a PS (Figura 73 y Tabla 13).

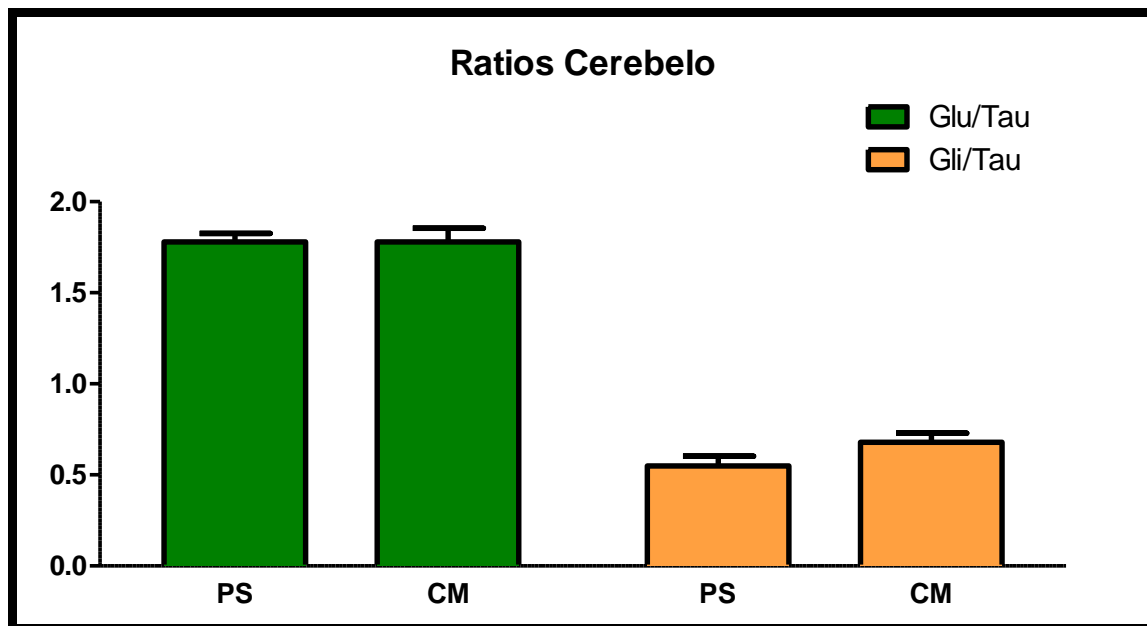


Figura 73: Ratios de los aminoácidos L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina cuantificados en cerebelo (pseudo-operación, PS, colestasis CM; para ratio L-Glu/Tau $n_{PS}=8$ y $n_{CM}=10$; para ratio Gli/Tau $n_{PS}=8$ y $n_{CM}=9$). Resultados: media \pm EEM; * $P<0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

Tabla 13: Resultados test t de Student de muestras independientes para los ratios de aminoácidos L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina, analizados en cerebelo.

Ratio Cerebelo	t _{gl}	P
L-Glutamato/Taurina	t ₁₆ = 0,004	0,997
Glicina/Taurina	t _{8,357} = 0,969	0,36

C. 3.B. Ratios Núcleo Estriado Dorsal

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental sometido a CM frente al grupo experimental sometido a PS (Figura 74 y Tabla 14).

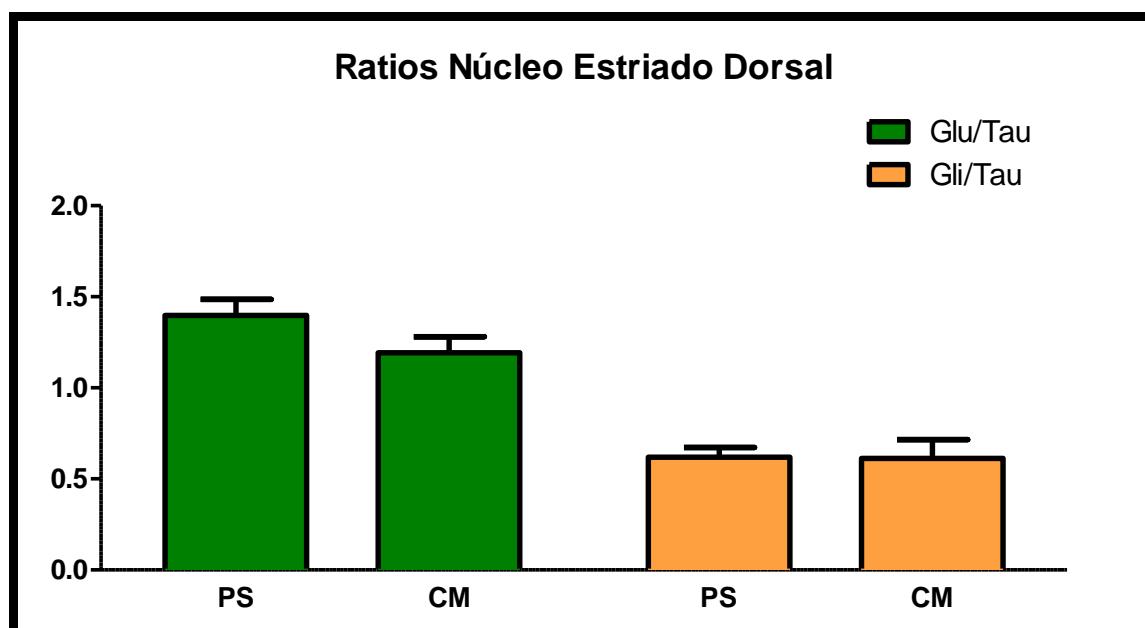


Figura 74: Ratios de los aminoácidos L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina cuantificados en núcleo estriado dorsal (pseudo-operación, PS, n=7; colestasis, CM, n=10). Resultados: media \pm EEM; *P<0,05 grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

Tabla 14: Resultados test t de Student de muestras independientes para los ratios de aminoácidos L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina, analizados en núcleo estriado dorsal.

Ratio Núcleo Estriado Dorsal	t _{gl}	p
L-Glutamato/Taurina	t ₁₅ = 1,591	0,133
Glicina/Taurina	t ₁₅ = 0,063	0,951

Resultados

C. 3.C. Ratios Hipotálamo

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental sometido a CM y el grupo experimental sometido a PS (Figura 75 y Tabla 15).

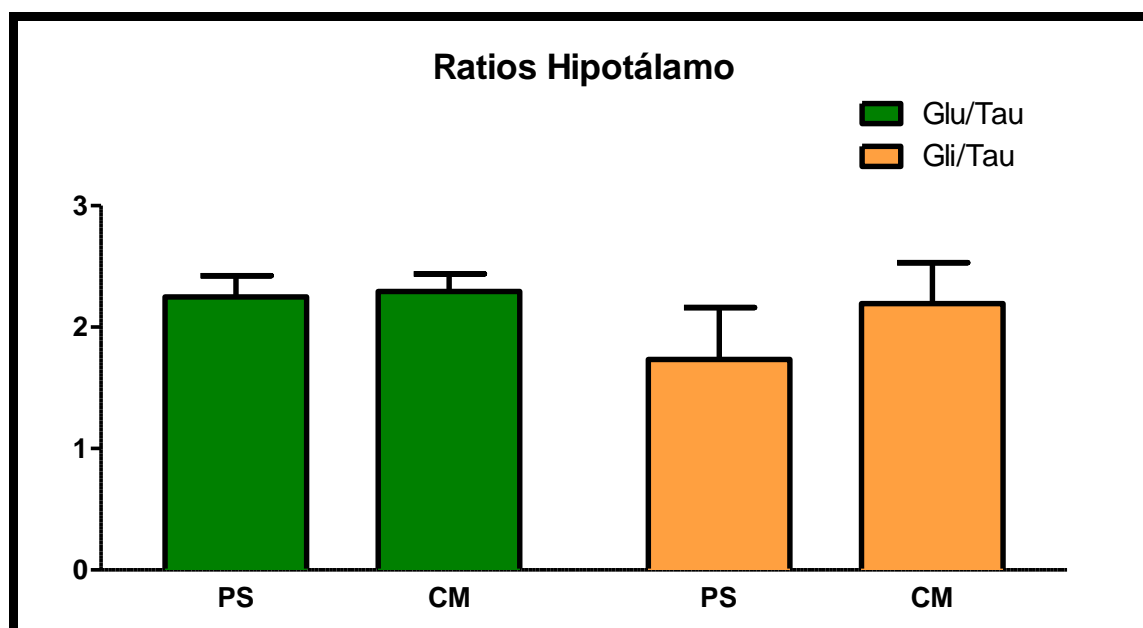


Figura 75: Ratios de los aminoácidos L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina cuantificados en hipotálamo (pseudo-operación PS, colestasis CM; para ratio L-Glu/Tau $n_{PS}=8$ y $n_{CM}=10$; para ratio Gli/Tau $n_{PS}=8$ y $n_{CM}=9$). Resultados: media \pm EEM; * $P<0,05$ grupo PS vs. grupo CM (t de Student).

Tabla 15: Resultados test t de Student de muestras independientes para los ratios de aminoácidos L-Glutamato/Taurina y Glicina/Taurina, analizados en hipotálamo.

Ratio Hipotálamo	t _{gl}	p
L-Glutamato/Taurina	t ₁₆ = 0,197	0,846
Glicina/Taurina	t ₁₅ = 0,855	0,406

C. 3.D. Ratios Plasma

Se observó un descenso estadísticamente significativo en el ratio L-Glutámico/Taurina ($t_{15}= 6,172$ $p<0,001$) y L-Glutámico/L-Alanina ($t_{15}= 7,27$ $p<0,0001$) en el grupo de ratas sometidas a CM frente al grupo de ratas PS. Por otro lado, se encontró un aumento del ratio Glicina/Taurina en el grupo CM frente al grupo PS, que no alcanzó diferencia estadísticamente significativa pero sus valores fueron próximos a ella, por lo que puede constituir una tendencia ($t_{12,887}= 2,092$ $p=0,057$) (Figura 76 y Tabla 16).

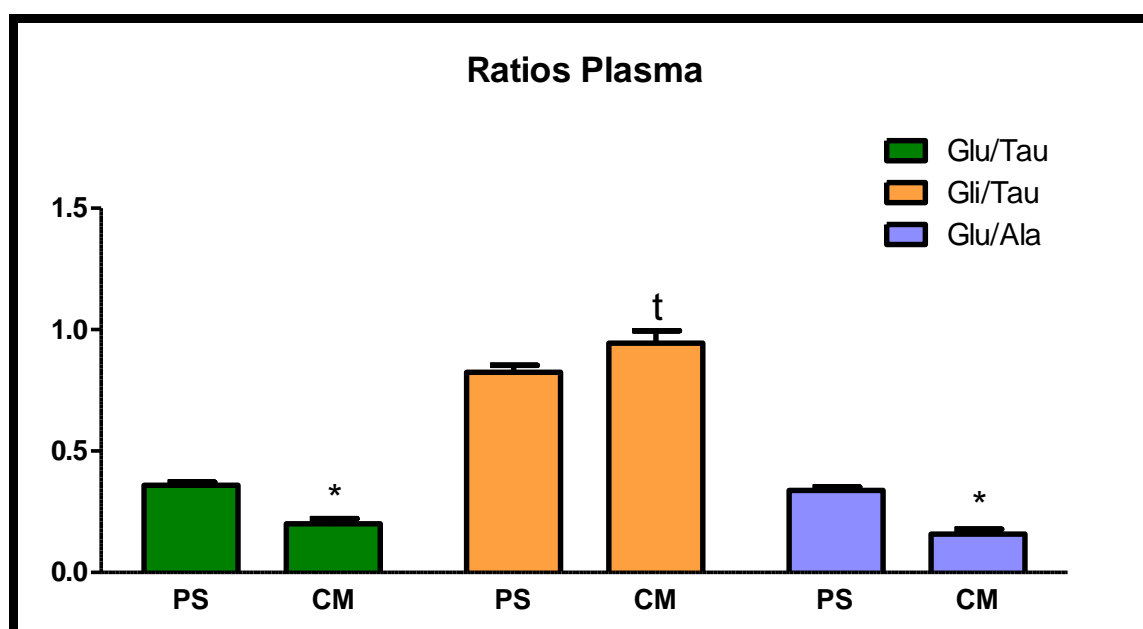


Figura 76: Representación gráfica de los ratios de los aminoácidos L-Glutamato/Taurina, Glicina/Taurina y L-Glutamato/l-Alanina cuantificados en plasma (pseudo-operación, PS, n=8; colestasis, CM, n=9). Resultados: media \pm EEM; * $P<0,05$ grupo PS vs. grupo CM; $t \rightarrow p= 0,057$ (t de Student).

Resultados

Tabla 16: Resultados test *t* de Student de muestras independientes para los ratios de aminoácidos L-Glutamato/Taurina, Glicina/Taurina y L-Glutamato/L-Alanina, analizados en plasma.

Ratio Plasma	t_{gl}	p
L-Glutamato/Taurina	$t_{15} = 6,172$	<0,001
Glicina/Taurina	$t_{12,887} = 2,092$	0,057
L-Glutamato/L-Alanina	$t_{15} = 7,27$	<0,0001

Discusión

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos descrito un modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica que genera un cuadro de encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica y caracterizamos algunas de las alteraciones vasculares y neuroquímicas asociadas.

Es posible establecer un paralelismo entre un cuadro infeccioso grave y la insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica que genera nuestro modelo de colestasis: la infección, como elemento “*crónico*”, puede ocasionar un cuadro “*agudo*” de sepsis que desencadene en fracaso MOF. La insuficiencia hepática compensada producto de la colestasis extrahepática microquirúrgica, como elemento “*crónico*”, puede ocasionar a las seis semanas del procedimiento un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, como elemento “*agudo*”, que mediante la implicación del LPS entre otros elementos, origine fracaso MOF.

La insuficiencia hepática presenta una serie de características imperantes a tener en cuenta para la discusión de nuestros resultados:

En primer lugar, se genera un aumento del catabolismo hepático, incrementando los niveles de aminoácidos glucogénicos en plasma; por ejemplo, la síntesis de isoleucina está muy disminuida por lo que la degradación de proteínas para su obtención se aumenta, por tanto, aumenta el catabolismo (Jalan et al. 2002). Por otro lado, el fracaso hepático también provoca la aparición de *circulación hiperdinámica*, donde juega un papel destacado la *vasculopatía y el trastorno endotelial*, el NO y el amoníaco (esto se explicará con detalle posteriormente), presentando aumento de los *shunts* porto-sistémicos, así como, desarrollo de HTP y disminución de perfusión cerebral (Jalan et al. 2002).

Asimismo, también aparece edema cerebral secundario a la tumefacción de los astrocitos por acúmulo de *glutamina*, agente osmótico utilizado para detoxificar amoníaco en estados de hiperamonemia como el que desencadena nuestro modelo experimental (Parekh et al. 2015), o que también se ve aumentada en situaciones de alteración del gen de la glutaminasa (Romero-Gómez et al. 2015).

Igualmente, es importante tener en cuenta que el ACLF establece un estado de respuesta inflamatoria sistémica alterada, caracterizado por aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y sucesivamente, por la migración de monocitos y alteraciones de la BBB (Butterworth 2013).

Todo ello genera un *ambiente hipóxico* en la neurona, tanto por disminución de aporte sanguíneo (Sawhney et al. 2016), pese a que el flujo pueda estar aumentado (Wright et al. 2014), como por la mayor dificultad de difusión del oxígeno en el parénquima cerebral por el edema cerebral (Park et al. 2014; Wright et al. 2014), el acúmulo de monocitos, citoquinas proinflamatorias y alteraciones de la BBB secundarias a afectación de los astrocitos (Wright et al. 2014). Esto, obliga a la célula cerebral a generar energía mediante *metabolismo anaerobio*, el cual no sigue la ruta metabólica fisiológica de fosforilación oxidativa con producción de energía mitocondrial empleando oxígeno, sino la glucólisis anaerobia y el catabolismo de aminoácidos glucogénicos (permite la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos incluyendo la utilización de varios aminoácidos, tales como ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamina, isoleucina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano, valina) (Choi et al. 2014). Es el denominado *Efecto Warburg*, que brevemente, consiste en la producción de energía en el citosol celular, de forma más rápida e intensa (el mismo sistema empleado en “*el vuelo del colibrí*”) que la producida por

fosforilación oxidativa pero de acción menos prolongada y con mayor liberación de productos nocivos del metabolismo (Butterworth 2013), mediante la transformación de glucosa en piruvato y posterior fermentación láctica, mediada por la enzima LDH, generando ácido láctico (ácido carboxílico con un grupo hidroxilo) en el astrocito (Choi et al. 2014), y sucesivamente acidificando el pH. La función de la producción del lactato es oxidar la nicotinamida adenina dinucleótico reducida (NADH) con H^+ , para generar la forma oxidada (NAD^+) necesaria para la glucólisis, y por consiguiente para continuar con la producción de adenosíntrifosfato (ATP), energía (Jalan et al. 2002; Park et al. 2014).

La consideración de todo lo descrito anteriormente, a saber, vasculopatía, hipoxia celular, glucólisis anaerobia, catabolismo de aminoácidos glucogénicos y *Efecto Warburg*, permite la introducción del concepto de *anaplerosis*, que consiste básicamente, en la síntesis *de novo* de mediadores del ciclo de Krebs para reponer las pérdidas (Figura 77) (Hassel 2000). Sir Hans Kornberg acuñó el término de *reacciones anapleróticas* en el año 1966, para describir una serie de rutas enzimáticas que reponen los grupos metabólicos *intermediarios* en el TCA (Sonnewald 2014); a modo de ejemplo, las células gliales cerebrales consumen α -cetoglutarato al sintetizar glutamina (Hassel 2000), proceso empleado a su vez para detoxificar amoníaco (Leke et al. 2011) en estados de hiperamonemia como el de ACLF. Ello implica, la utilización de *reacciones de carboxilación* (basadas en la electrolisis reductiva de una disolución que contiene un compuesto orgánico, en presencia de CO_2) las cuales son más activas en los astrocitos que en las neuronas (Olsen et al. 2015), así como, el empleo de *rutas metabólicas* menos habituales (Schousboe et al. 2013; Cooper et al. 2016) que implican a enzimas como la enzima malic, la enzima fosfoenopiruvatocarboxilasa, la enzima propionil-CoA carboxilasa, la

Discusión

enzima piruvatocarboxilasa (Hassel 2000), o, la utilización de la enzima ω -Amidasa que es importante en el metabolismo de la glutamina y de la asparagina y, podría serlo para la síntesis de intermediarios del TCA en condiciones de hipoxia (Cooper et al. 2016).

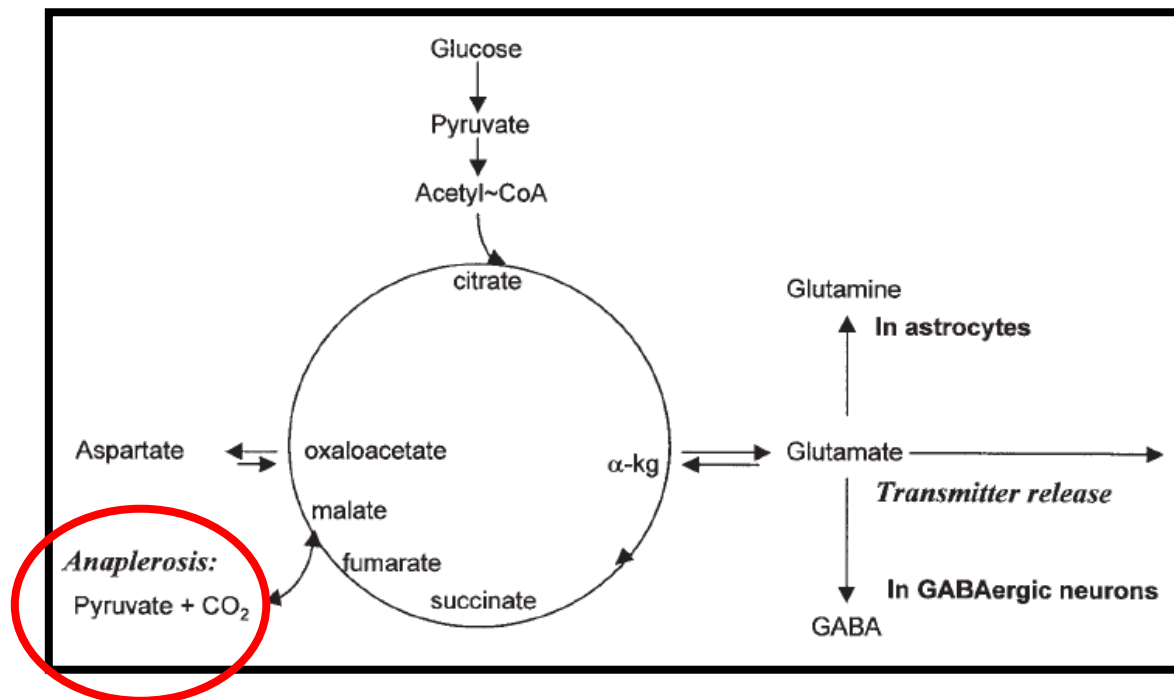


Figura 77: Representación gráfica del TCA y de la carboxilación, que compensa la pérdida de α -cetoglutarato debido a la liberación de glutamato, GABA y glutamina. Tomado de: *Carboxylation and Anaplerosis in Neurons and Glia* (Hassel 2000).

Añadido a esto, otro mecanismo implicado que obliga al consumo de mediadores del TCA, es la utilización de esta ruta anaerobia como fuente energética (Figura 78) (Schousboe et al. 2013). La oxidación completa del glutamato más el reciclaje del piruvato y la energía generada por el TCA suponen el 75% de la energía en forma de ATP que se proporcionaría por oxidación de la glucosa (Schousboe et al. 2013). La interrelación entre este sistema de producción energética anaeróbica con el mantenimiento de la homeostasis del amonio/amoniaco y del ciclo

glutamato/GABA es estrecha, porque los transportadores que de ello participan son dependientes de gradiente sodio-potasio-ATPasa, que precisa un aporte de energía suficiente para su correcto mantenimiento (Schousboe et al. 2013). En resumen, el concepto de *reacciones anapleróticas* resulta útil para intentar explicar en parte las anomalías en los niveles de aminoácidos encontrados tanto a nivel cerebral como periférico, tal y como discutiremos más adelante.

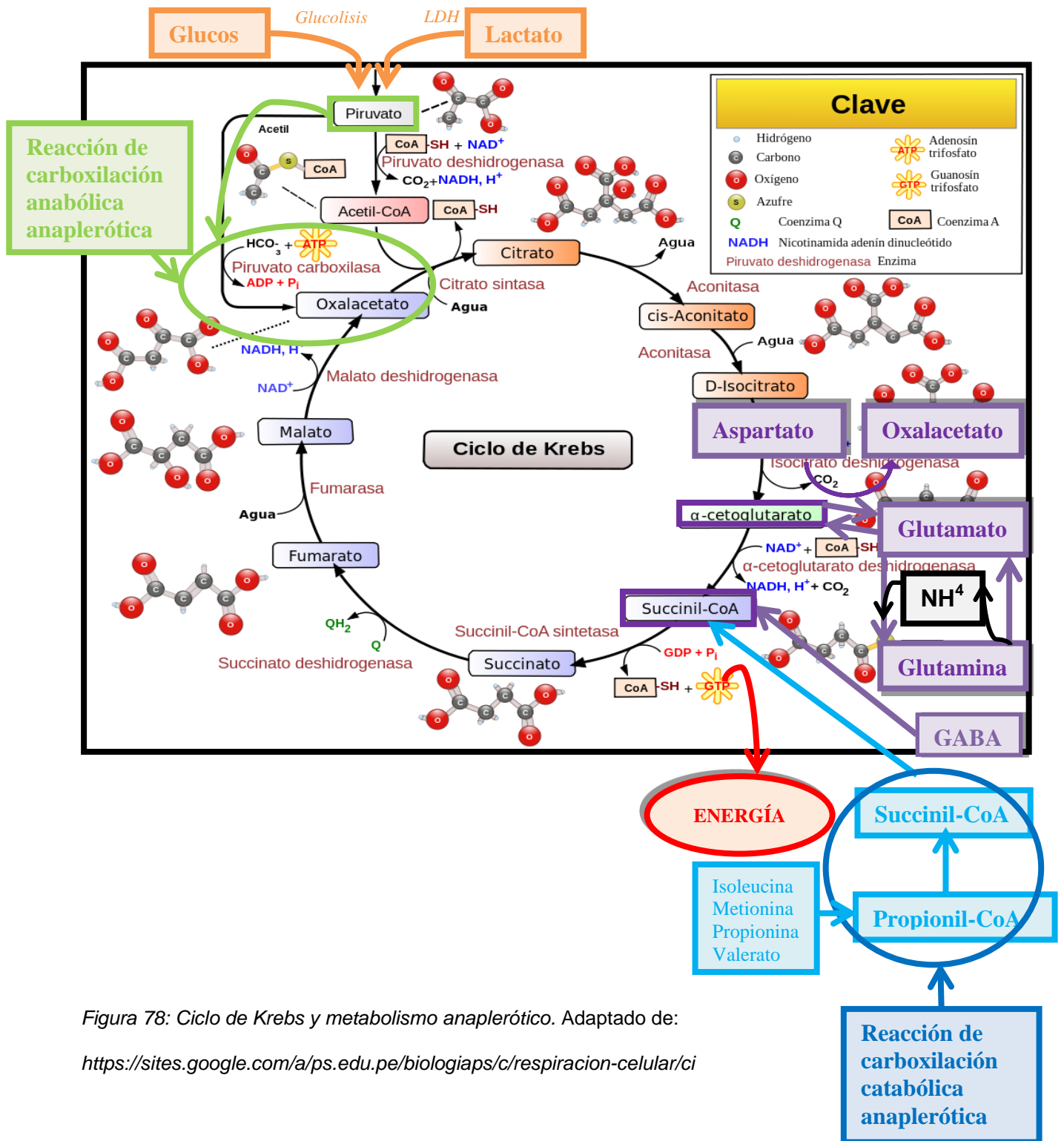


Figura 78: Ciclo de Krebs y metabolismo anaplerótico. Adaptado de:
<https://sites.google.com/a/ps.edu.pe/biologiaps/c/respiracion-celular/ci>

Regresando al tema de las alteraciones vasculares, en el ACLF se establecen modificaciones vasculares sistémicas, que concretamente en cerebro, pueden ser desencadenantes de la HE aguda-sobre-crónica (Wright et al. 2014; Jalan 2005), objeto de estudio de este trabajo; es decir, el *statu quo* propio del SNC podría estar amenazado por alteraciones vasculares sistémicas y metabólicas consecuentes al ACLF. La HE, como se explicó anteriormente, es un síndrome neuropsiquiátrico desarrollado por cerca del 30% de los pacientes con colestasis hepática (Cauli et al. 2009a; Leke et al. 2011; Felipo 2013; González-Usano et al. 2013). En la HE se han descrito modificaciones cerebrovasculares como la pérdida de la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Peterson et al. 2011; Sawhney et al. 2016), observándose un aumento o una disminución en la resistencia de los vasos cerebrales dependiendo de la gravedad de la patología (Hollingsworth et al. 2010). Estas alteraciones llevan a un descenso o a un incremento en el flujo sanguíneo cerebral respectivamente, y están mediadas en muchas ocasiones por el endotelio de los vasos cerebrales.

Estudios previos han demostrado que un estado proinflamatorio sistémico, en el que bien, la hiperamonemia generada por la insuficiencia hepática secundaria a colestasis, bien las citoquinas resultantes de un cuadro de sepsis, o un estado de neuroinflamación también estimulado por citoquinas sistémicas y/o hiperamonemia por fracaso hepático, podrían generar la activación a nivel cerebral de la microglía y la producción de factores proinflamatorios, empeorando los síntomas neuropsiquiátricos de la HE (Butterworth 2013; Rama Rao et al. 2014b; Macías-Rodríguez et al. 2015). Reforzando esta hipótesis, se han observado correlaciones entre el grado de encefalopatía con el grado de activación de la microglía y con los niveles de citoquinas (Butterworth 2013). Tal estado proinflamatorio puede modificar la liberación de factores endoteliales vasoactivos en varios lechos vasculares,

incluyendo arterias cerebrales (Faraci et al. 1998; Andresen et al. 2006). Uno de los factores vasoactivos endoteliales esenciales modificados por la inflamación es el NO (Duchini 1996), que ejerce efecto vasodilatador sobre arterias tanto “*in vivo*” como “*ex vivo*” (Katusic et al. 1989; Marsden et al. 1992; Yu et al. 1992; Brian et al. 1994; Davis et al. 2011; Liedtke et al. 2013), por activación de la guanilatociclasa soluble o produciendo hiperpolarización a través de la apertura de canales de potasio (Katusic et al. 1989; Marsden et al. 1992; Yu et al. 1992; Brian et al. 1994; Faraci & Heistad 1998; Andresen et al. 2006; Davis et al. 2011).

En general, el papel que desempeña el NO en la cirrosis depende del lecho vascular analizado. Así, se han descrito descensos en la liberación de NO en vena porta, lo que conlleva un aumento en la resistencia en su lecho vascular (Lee et al. 2010). Por otra parte, se han descrito incrementos en la liberación de NO en el sistema vascular periférico, participando en el desarrollo de flujo sanguíneo hiperdinámico en la circulación esplácnica (Baron et al. 2000; Engin et al. 2003; Bolognesi et al. 2014) y sistémica (Wiest et al. 2002; Triggle et al. 2012; Bolognesi et al. 2014; Bosch et al. 2015; Hollenberg et al. 2016) característico de la cirrosis hepática. Sin embargo, no hay estudios con respecto a la liberación de NO en el sistema cerebrovascular en estados de colestasis. Al analizar la liberación del metabolito estable del NO, los nitritos, no detectamos niveles basales. No obstante, al inducir la liberación de nitritos mediante estimulación de los vasos cerebrales con el agonista endotelial BK, observamos un aumento en los nitritos en arterias cerebrales de ratas sometidas a CM en comparación con ratas PS, de forma similar a como se ha presentado en otros lechos vasculares (Xavier et al. 2010; Sastre et al. 2011; Sastre et al. 2016b).

El NO es sintetizado debido a la acción de la isoforma de NOS inducible iNOS, y las isoformas constitutivas eNOS y nNOS. En la cirrosis hepática, la expresión de iNOS está incrementada en el lecho vascular esplácnico (Rodrigo et al. 2010), sugiriendo una implicación del NO derivado de iNOS en el desarrollo de la circulación hiperdinámica (Xu et al. 2000; Bhimani et al. 2003; Ferguson et al. 2006; Xavier et al. 2010). Ya que iNOS juega un papel relevante en la síntesis de NO en vasos cerebrales en condiciones de inflamación (Rama Rao et al. 2014a; Rama Rao et al. 2014b), se han analizado las posibles diferencias en la expresión de iNOS en nuestras condiciones experimentales, encontrando un aumento de la expresión de dicho enzima en arterias cerebrales de animales sometidos a CM. Por lo tanto, el incremento de la expresión de iNOS en animales sometidos a CM podría explicar el aumento en la liberación de nitritos en este grupo experimental.

Sin embargo, no hemos de descartar la posible participación de las isoformas de NOS constitutivas, eNOS y nNOS, en el aumento de la liberación de NO en arterias cerebrales de animales sometidos a CM, puesto que dichas enzimas constitutivas están presentes en el endotelio de las arterias cerebrales (Chuang et al. 2014). Al analizar los niveles de eNOS, encontramos un aumento en su expresión en arterias cerebrales de ratas sometidas a CM, tal y como ha sido descrito en lecho vascular esplácnico y sistémico en diversos modelos de cirrosis (Wright et al. 2012; Xavier et al. 2010; Bosch et al. 2015). Asimismo, también observamos un aumento de fosforilación de eNOS en su residuo de Ser 1177, lo que indica un aumento en su activación, como previamente se había descrito en el lecho vascular mesentérico (Xavier et al. 2010). Estos resultados están en consonancia con varios artículos publicados, mostrando que eNOS, junto con iNOS, desempeña un papel importante como fuente enzimática de la sobreproducción de NO vascular en la cirrosis

hepática (Jacob et al. 1993; Cahill et al. 1995; Martin et al. 1998; Wiest 2007; Xavier et al. 2010; Aldridge et al. 2015; Bosch et al. 2015).

El NO derivado de nNOS está implicado en el incremento en la vasodilatación observado en los vasos espláncnicos y sistémicos en cirrosis (Xu et al. 2000; Peterson et al. 2011; Sastre et al. 2011; Sastre et al. 2016a). Varios artículos han descrito que nNOS está presente en cultivos de células endoteliales procedentes de diferentes lechos, ejerciendo un papel antiinflamatorio (Peterson et al. 2011; Chakrabarti et al. 2012). Con respecto a nNOS en nuestro estudio, los resultados obtenidos muestran ausencia de modificaciones tanto en la expresión de nNOS como en su fosforilación en el residuo de Ser 1177, lo cual contrasta con estudios previos que refrendan el poder antiinflamatorio de nNOS en cultivos de células endoteliales (Xu et al. 2000; Chakrabarti et al. 2012). Los diferentes tejidos y modelos experimentales podrían explicar esta discrepancia.

En conjunto, estos resultados muestran que el incremento observado en la liberación de nitritos en arterias cerebrales de ratas sometidas a CM es debido a un aumento de la actividad de eNOS e iNOS.

Aparte del exceso en la generación de NO en la circulación esplácnica, estudios realizados en ratones *knockout* para eNOS e iNOS sugieren que en la patogénesis de la vasodilatación arterial en la cirrosis podrían estar implicadas modificaciones en otros factores vasoactivos diferentes del NO (Theodorakis et al. 2003; Davis et al. 2011; Peterson et al. 2011). Los prostanoides endoteliales juegan un papel central en la regulación del tono vascular en condiciones fisiológicas (Mombouli et al. 1999; Blanco-Rivero et al. 2005; Mollace et al. 2005; Davis et al. 2011). Sin embargo, su producción se modifica en ciertas situaciones patológicas, incluyendo estados de inflamación, como lo son la HTP y la cirrosis (Mollace et al.

2005; Xavier et al. 2010; Peterson et al. 2011). Las dos principales isoformas enzimáticas implicadas en su producción son COX-1 y COX-2.

Como con anterioridad en otros modelos experimentales de cirrosis se ha descrito, modificaciones en la expresión de COX-2, concretamente *sobreexpresión* en condiciones de inflamación en lecho vascular esplácnico (Yamagata et al. 1993; Brian et al. 2001; Xavier et al. 2010; Davis et al. 2011; Peterson et al. 2011) y alteraciones en la expresión de COX-1, constitutiva de muchos tejidos destacando entre ellos el endotelio y neuronas cerebrales (Peterson et al. 2011), se analizaron posibles modificaciones en la expresión de ambas isoformas de COX. Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de COX-2 en arterias cerebrales de animales sometidos a CM mientras que la expresión de COX-1 no se vio modificada. Numerosos estudios han puesto el punto de mira sobre el rol de los factores derivados de COX, tanto vasodilatadores (PGI_2) como vasoconstrictores (TXA_2), en los procesos observados en la cirrosis (Gatta et al. 2008; Blanco-Rivero et al. 2009; Xavier et al. 2010; Davis et al. 2011; Peterson et al. 2011; Bolognesi et al. 2014). Con ello, el aumento en la expresión de COX-2 en arterias cerebrales de ratas sometidas a CM sugiere cambios en la producción de prostanoïdes.

Uno de los principales metabolitos de COX en vasos cerebrales es la PGI_2 (Brian et al. 2001; Davis et al. 2011; Peterson et al. 2011). Cuando se analizó en arterias cerebrales de animales sometidos a CM la producción del metabolito estable de PGI_2 , 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$, se observó que los niveles basales eran indetectables pero que tras estímulo con BK se encontraban aumentados en el grupo de CM, de modo similar a lo descrito para aorta abdominal (Blanco-Rivero et al. 2009) y arterias mesentéricas de resistencia (Xavier et al. 2010). Por otra parte, no se observaron diferencias en la expresión de PGI_2S , enzima primordial en la síntesis de PGI_2 . Este

resultado sugiere que el aumento en la liberación de PGI_2 podría estar debido exclusivamente al aumento del sustrato de PGI_2S formado por COX-2, aunque un incremento en la actividad de la PGI_2S tampoco se podría descartar.

Junto con el prostanoides vasodilatador PGI_2 , el vasoconstrictor TXA_2 tiene también un papel importante en la regulación del tono vascular en arterias cerebrales (Hou et al. 2000; Davis et al. 2011). De hecho, se han definido interrelaciones entre ambos prostanooides (Cheng 2002). Se han descrito modificaciones en la participación del TXA_2 en diferentes patologías (DeWitt et al. 1988; Kramer 1997; Cheng et al. 2002). Con respecto a la colestasis y a la cirrosis, se han observado tanto aumentos como descensos en la liberación de TXA_2 en vena porta y lecho vascular esplácnico respectivamente (Iwakiri et al. 2006; Gatta et al. 2008; Xavier et al. 2010), pero no existen estudios que analicen las posibles modificaciones en este factor vasoconstrictor en arterias cerebrales, por lo que se determinó la liberación del metabolito estable del TXA_2 , el TXB_2 . Los niveles basales de dicho metabolito, no fueron detectables; mientras que los niveles inducidos por BK fueron similares en ambos grupos experimentales. Este resultado fue coherente con el hecho de que la expresión de TXA_2S fuera similar en los dos grupos de estudio. En conjunto, estos datos indicarían que PGI_2 podría participar en el incremento de la vasodilatación mediante el aumento de su producción, mientras que por otro lado se observó la ausencia de modificación en la liberación de TXA_2 , eliminando así el papel de este factor vasoconstrictor en la regulación del tono vascular de las arterias cerebrales de ratas sometidas a CM.

Además de los factores vasomotores que ya se han analizado, el factor contráctil derivado de endotelio ET-1 también colabora en la regulación del tono vascular en arterias cerebrales (Yu et al. 1992; Peterson et al. 2011), y su liberación

puede ser modificada en diferentes situaciones de enfermedad hepática (Matsuo et al. 2001; Gatta et al. 2008; Davis et al. 2011; Peterson et al. 2011; Bolognesi et al. 2014). En cuadros de cirrosis, se ha publicado la presencia de incrementos en la producción de ET-1 a nivel de la circulación sinusoidal intrahepática, jugando un papel crucial en el desarrollo de colestasis hepática (Nagai et al. 2010). Asimismo, se ha observado una disminución tanto en los niveles de ET circulante como en la vasoconstricción inducida por ET-1 en vasos sistémicos pertenecientes a ratas con hipertensión portal y cirróticas (Yu et al. 1992; Bolognesi et al. 2014). En condiciones basales, no se detectó ET-1. Sin embargo, al inducir su liberación con BK, se advirtió un descenso de ET-1 en arterias cerebrales de los animales sometidos a CM. Dicha disminución de ET-1 se correspondió con el descenso de la expresión de ECE-1 apreciado en el mismo grupo experimental.

Como se comentó previamente, alteraciones en el equilibrio de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras están presentes frecuentemente en la cirrosis hepática (Bolognesi et al. 2014), provocando variaciones en el flujo sanguíneo a través de muchos lechos vasculares (Xavier et al. 2010; Blanco-Rivero et al. 2011; Sastre et al. 2011; Bolognesi et al. 2014; Bosch et al. 2015; Sastre et al. 2016b). Estas modificaciones podrían conducir a aumento de la vasodilatación de los vasos cerebrales. Los grandes vasos cerebrales, como la ACM, contribuyen de forma importante a establecer la resistencia total cerebrovascular, siendo los principales determinantes de la presión local microvascular (Faraci et al. 1990; Davis et al. 2011), por esta razón se estudió si las variaciones en los factores vasoactivos tenían capacidad de modificar la respuesta vasodilatadora a BK en dicha arteria, observándose un incremento en la vasodilatación en ACM de animales sometidos a CM. Este resultado concuerda con el aumento en la liberación de los factores

vasodilatadores NO y PGI₂ descritos hasta el momento, así como, con la disminución en la liberación del vasoconstrictor ET-1. Asimismo, en diferentes lechos vasculares de otros modelos de insuficiencia hepática también se observó un incremento en la vasodilatación dependiente de endotelio (Xavier et al. 2010; Hollenberg et al. 2016).

Conjuntamente, los resultados recogidos en el presente ensayo mostraron en el grupo de ratas sometidas a CM un aumento en los factores vasodilatadores derivados de endotelio, NO y PGI₂, y un descenso en el factor vasoconstrictor, ET-1. En conjunto, estas alteraciones desencadenaron un incremento de respuesta vasodilatadora en ACM de animales sometidos a CM. Este incremento del tono vasodilatador podría jugar un papel determinante sobre el acrecentamiento de flujo sanguíneo cerebral, *circulación hiperdinámica*, que se observaría en la HE, pero que no supondría un mayor aporte de O₂ al parénquima cerebral sino todo lo contrario, un estado de hipoxia por que no llegaría el suficiente O₂ a las células.

Por lo tanto, la vasculopatía causada por el ACLF desencadena el desarrollo de *circulación hiperdinámica* esplácnica y sistémica, tal como recoge la literatura (Jalan et al. 2002; Bosch et al. 2015) y como se ha evidenciado en nuestro modelo experimental (Aller et al. 2009b; Kruse et al. 2010; Sastre et al. 2016b). Esto provoca, junto a otros desencadenantes, el desarrollo de *isquemia* en el SNC e *hipoxia* celular cerebral, considerándose a la vasculopatía secundaria a ACLF un factor determinante en la etiopatogenia de la HE aguda-sobre-crónica. En conclusión, la propia *circulación hiperdinámica* en el sistema vascular cerebral es

uno de los elementos que facilitan la hipoperfusión, la isquemia del SNC y la hipoxia tisular (Jalan et al. 2002; Wright et al. 2014; Sawhney et al. 2016).

Otro elemento implicado, es el *edema cerebral* secundario a la utilización del ciclo glutamato-glutamina como elemento detoxificador de amonio, necesario ante la hiperamonemia que acontece en el ACLF (Jalan et al 2002; Bosch et al. 2015). Como elemento previo al edema, ocasiona tumefacción de los astrocitos por acúmulo de glutamina, que participa como agente osmótico (Jalan et al. 2002; Leke et al. 2011; Butterworth 2013; Rama Rao et al. 2014a; Parekh et al. 2015; Cooper et al. 2016) y posteriormente aparece el edema cerebral propiamente dicho, que es de origen multifactorial, aunque principalmente citotóxico (Wright et al. 2014) frente a vasogénico, y dificulta la difusión del oxígeno (Wright et al. 2014).

Otro factor a tener en cuenta en la HE es el *estado inflamatorio sistémico* existente en estos pacientes, que es sinérgico a la hiperamonemia y/o por ejemplo, a una posible infección intercurrente, y debido al estrés nitrosativo y/o al estrés oxidativo, cursa con liberación de RLO: radicales hidroxilo, $\cdot\text{OH}$, aniones superóxido, O_2^- , peróxido de hidrógeno, H_2O_2 (Moreau et al. 2013; Wright et al. 2014; Parekh et al. 2015). El *estado inflamatorio sistémico* genera alteración del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (factor de transcripción NF-KB) y desencadena la activación de la microglía, el reclutamiento de monocitos, la producción de moléculas de adhesión y de citoquinas proinflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12) (Jalan et al. 2002) y la neuroinflamación (Butterworth 2013; Moreau et al. 2013), otro elemento más que facilita el desarrollo de un ambiente hipóxico cerebral.

Las *alteraciones en la BBB* también han de ser tenidas en cuenta en este contexto. Tales *alteraciones* se producen por un trastorno funcional que aumenta el

transporte de aminoácidos neutros y disminuye el transporte de aminoácidos básicos (Jalan et al. 2002). También juegan un papel las alteraciones endoteliales (Butterworth 2013) secundarias a la agresión que provoca el estado proinflamatorio sistémico presente en la colestasis, que compromete la permeabilidad de la BBB (Butterworth 2013; Wright et al. 2014; Sawhney et al. 2016) participando citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, migración de macrófagos/monocitos.

Como consecuencia a tales agresiones sobre el SNC, éste responde con el aumento en el estímulo para la síntesis e hiperexpresión del factor inducible por hipoxia ($\text{HIF-1}\alpha$) (Aller et al. 2006; Marco et al. 2015), que provoca la activación de una serie de rutas metabólicas con la finalidad de que la célula pueda establecer mecanismos de protección frente a la isquemia e hipoxia celular (Figura 79). Existe relación entre la hiperamonemia, la inflamación y la oxigenación cerebral, pero no se ha demostrado que sea sinérgica (Sawhney et al. 2016).

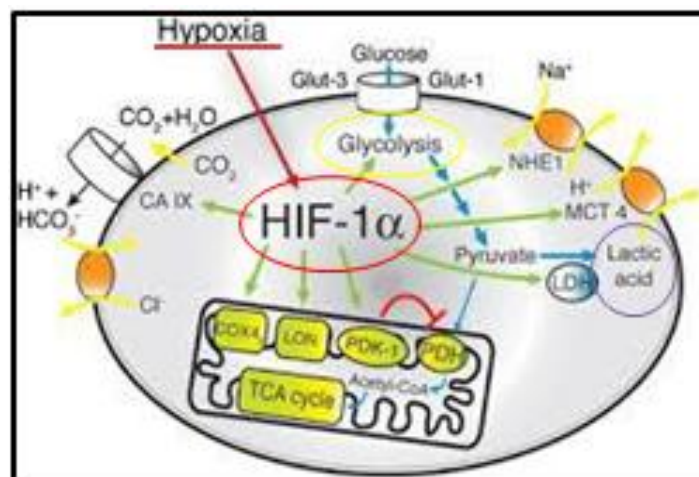


Figura 79: Tomado de: *Exercise physiology& training. Fisiología del ejercicio*. 5 de octubre de 2015.

Los mecanismos mencionados anteriormente consisten, entre otros, en la síntesis de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula la

angiogénesis, en la producción de energía a través de metabolismo anaerobio mediante el empleo de LDH, en la síntesis de ácido láctico y otros *nuevos* metabolitos (Butterworth 2013), estableciendo así los *mecanismos anapleróticos* y las nuevas rutas del metabolismo energético (Aller et al. 2010; Bak et al. 2013; Schousboe et al. 2013; Walls et al. 2014; Cooper et al. 2016) mencionadas en párrafos anteriores. Se podría decir, que la célula cerebral *subsana* de este modo la disminución del metabolismo de fosforilación oxidativa (reducción en la síntesis de ATP, depresión de la respiración mitocondrial) con la producción de energía mediante otras rutas como el ciclo de Krebs, promoviendo para ello un continuo aporte de intermediarios del mismo (Brunengraber et al. 2006; DeBerardinis et al. 2007), y así mantener la homeostasis global del medio interno; como ya se reflejó en líneas superiores, las células del individuo afecto de ACLF implementan un conjunto de adaptaciones patológicas al nuevo entorno caracterizado por la circulación sanguínea hiperdinámica (Jalan et al. 2002; Bosch et al. 2015), que las permitan en un principio *sobrevivir* en un ambiente hipóxico y caracterizado por un estado de respuesta inflamatoria sistémica, pero que finalmente llevará al individuo a MOF.

Este MOF, se clasifica en función de los principales órganos o sistemas afectados. En el *riñón* se desencadena el *síndrome hepatorenal*, que brevemente, consiste en una hipoperfusión renal severa por aumento de la resistencia vascular a ese nivel. La cirrosis activa el eje renina-angiotensina-aldosterona, que finalmente provoca la vasoconstricción de la arteria aferente renal, la activación de ET-1 y la retención de sodio y agua por la nefrona (Jalan et al. 2002). Así mismo, los pacientes con ACLF, pueden desarrollar *alteraciones inmunitarias*, que en una fase temprana, presentan una respuesta inicial exagerada del sistema inmunitario innato ante estímulos como el LPS bacteriano, activando PAMPs con una gran producción

de citoquinas (Arroyo et al. 2015), estado al cual prosigue una situación de *anestesia inmunitaria* que favorece nuevas infecciones (Arroyo et al. 2015). En cuanto a las *infecciones* es característico que se generen factores proinflamatorios como resultado de la activación intracelular de rutas proinflamatorias cuyos ligandos son fragmentos de patógenos como el LPS (producto en muchas ocasiones de la traslocación bacteriana) (Moreau et al. 2013; Arroyo et al. 2015). A *nivel hepático* aparecen señales bioquímicas generadas por células hepáticas muertas o en proceso de apoptosis causada por el mecanismo de hepatopatía subyacente, similares en cuanto a consecuencias a las PAMPs, pero que en este caso son denominadas DAMPs (Moreau et al. 2013; Arroyo et al. 2015). A nivel *cerebral* se producen las alteraciones descritas en los apartados previos acerca de la HE, alteración de la BBB, cambios en el metabolismo energético, modificaciones en la neurotransmisión cerebral, metabolismo del amoníaco, edema cerebral y acidificación del medio (Jalan et al. 2002). Sobre este apartado nos vamos a centrar en las líneas siguientes en las que se continuará con la discusión concerniente a la expresión de aminoácidos en el SNC y en plasma.

En la discusión sobre la implicación de las alteraciones en aa en el contexto de la HE es pertinente plantear una pregunta y realizar una consideración. La pregunta sería: ¿cómo se caracteriza la HE aguda-sobre-crónica a nivel de aa y cómo se diferencia de otras? La consideración sería que en situación de HE aguda-sobre-crónica los aa son empleados no sólo como neurotransmisores, sino también como elementos del *metabolismo energético anaerobio anaplerótico*, en condiciones de hipoxia celular (Hassel 2000; Sonnewald 2014), como las que genera la HE aguda-sobre-crónica.

Ya centrados en nuestros resultados, en el *cerebelo*, podemos afirmar que existe un aumento en la concentración de *GABA* en el grupo de animales sometidos a CM frente al grupo de animales sometidos a PS, así como valores más elevados de glutamato (tendencia no estadísticamente significativa).

Se han descrito incrementos en la *actividad GABAérgica* en cultivos celulares, de animales de experimentación y de pacientes con HE (Leke et al. 2013), a través de tres posibles mecanismos: aumento de liberación *GABA*, decremento de su consumo por los astrocitos e incremento de la estimulación de los receptores *GABA_A* por el propio neurotransmisor (Leke et al. 2011; Llansola et al. 2013; Ott et al. 2014). Además, aceptando que el modelo de CM en rata provoca un cuadro de ACLF (Aller et al. 2009b) robustamente defendido por estudios previos, asumimos el desarrollo de hiperamonemia, que a su vez se relaciona con el aumento del tono *GABAérgico* en cerebelo de ratas colestásicas (Felipo et al. 2002; Felipo 2013), como también se refleja en los resultados de nuestro modelo de CM.

Proponemos que el aumento de los niveles de *GABA* procede de un incremento en su síntesis desde el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, más que como resultado de la descarboxilación directa de glutamato vía *GAD*, donde además no existen diferencias entre las dos isoformas de *GAD*, *GAD 65* y *GAD 67*, en un modelo de colestasis (Leke et al. 2014; Leke et al. 2015). Así mismo, la exposición a amoníaco en cultivos celulares, conduce a una actividad elevada *GABAérgica*, glutamatérgica, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y a nivel neuronal (Figura 80) (Leke et al. 2011; Palomero-Gallagher et al. 2013; Leke et al. 2014a; Leke et al. 2014b).

Otra posible explicación afectaría al mecanismo relacionado con los transportadores interneuronales implicados. Se ha descrito un aumento de *SN2*

(transportador de glutamina en el astrocito), responsable de la liberación de glutamina por parte del astrocito a nivel de corteza cerebral en ratas sometidas a ligadura del conducto biliar principal frente a PS (Leke et al. 2014a); esto demuestra que existe evidencia *in vivo* de transportadores de aminoácidos para trasladar amoniaco entre neuronas y astrocitos (Rothman et al. 2012), porque el gran flujo de amonio que el ciclo glutamato/glutamina genera, provoca una gran demanda de regreso de amoniaco desde las neuronas a los astrocitos para mantener el equilibrio del nitrógeno (Rothman et al. 2012), aunque no sea estequiométrico. Podría ser una explicación para un aumento de sustrato dirigido a la síntesis de GABA y glutamato.

En otros modelos de daño hepático crónico, como sucede en modelos de *shunt* porto-cava o ligadura de la vena porta en rata, también se reporta un aumento de tono GABAérgico en cerebelo (Cauli et al. 2009a; Llansola et al. 2013) y la ausencia de alteración de los niveles de GABA en otras regiones como el núcleo estriado y la corteza cerebral. A parte del aumento de los niveles de GABA, lo cual conduce a una mayor activación del receptor GABA_A, se han observado otros dos factores que contribuyen al aumento del tono GABAérgico en estos modelos (Cauli et al. 2011; Leke et al. 2011): aumento de alotetrahidrodesoxicorticosterona (THDOC), neuroesteroide que realza la activación de receptores GABA_A, y aumento de las subunidades del receptor GABA_A $\alpha 1$, $\alpha 6$ y $\gamma 2$.

Extrapolando al ser humano el aumento de las concentraciones de GABA observado en la HE experimental, siendo GABA un neurotransmisor cuya principal función es la reducción de la excitabilidad neuronal a través del receptor GABA_A, podría explicar la hipocinesia de los pacientes con HE (Cauli et al. 2009b; González-Usano et al. 2013; Cauli et al. 2014).

En el *núcleo estriado dorsal* se describe una tendencia al descenso de GABA, aa con función inhibitoria en el SNC y que podría participar en la sintomatología de aleteo o *flapping* de la HE, al consumirse como mediador anaplerótico del metabolismo energético de la célula a través del TCA a pesar de que, en casos descritos con modelos de daño hepático y HE realizados mediante *shunt* porto-cava en rata, no se muestren diferencias entre los grupos control e intervención a nivel de GABA (Cauli et al. 2009a; Brunelli et al. 2012; Cauli et al. 2014).

A nivel de glutamato estriatal, también se observa una disminución en el brazo del estudio sometido a CM, pero tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre PS y CM, sin embargo, existe una tendencia al incremento de taurina en CM, pudiendo asociarse este efecto a su valor antioxidante y *detoxificador* (Palacios Gil-Antuñano et al. 2011), no obstante se trata de una tendencia no estadísticamente significativa, necesitándose futuros estudios para su caracterización en este modelo experimental. Por otro lado e igualmente a como sucede con el glutamato, la concentración de L-aspartato también se encuentra disminuida en CM, pero sin llegar a alcanzar significación estadística.

Una explicación plausible a alguna de las ausencias de diferencias esperadas sería que pese a la HE ocasionada en estos animales, pueda tener cierta repercusión sobre los parámetros estudiados en este área cerebral concreta, habría mecanismos reguladores descritos previamente que podrían ser capaces de compensar los desequilibrios que aparecen en la HE (Figura 80).

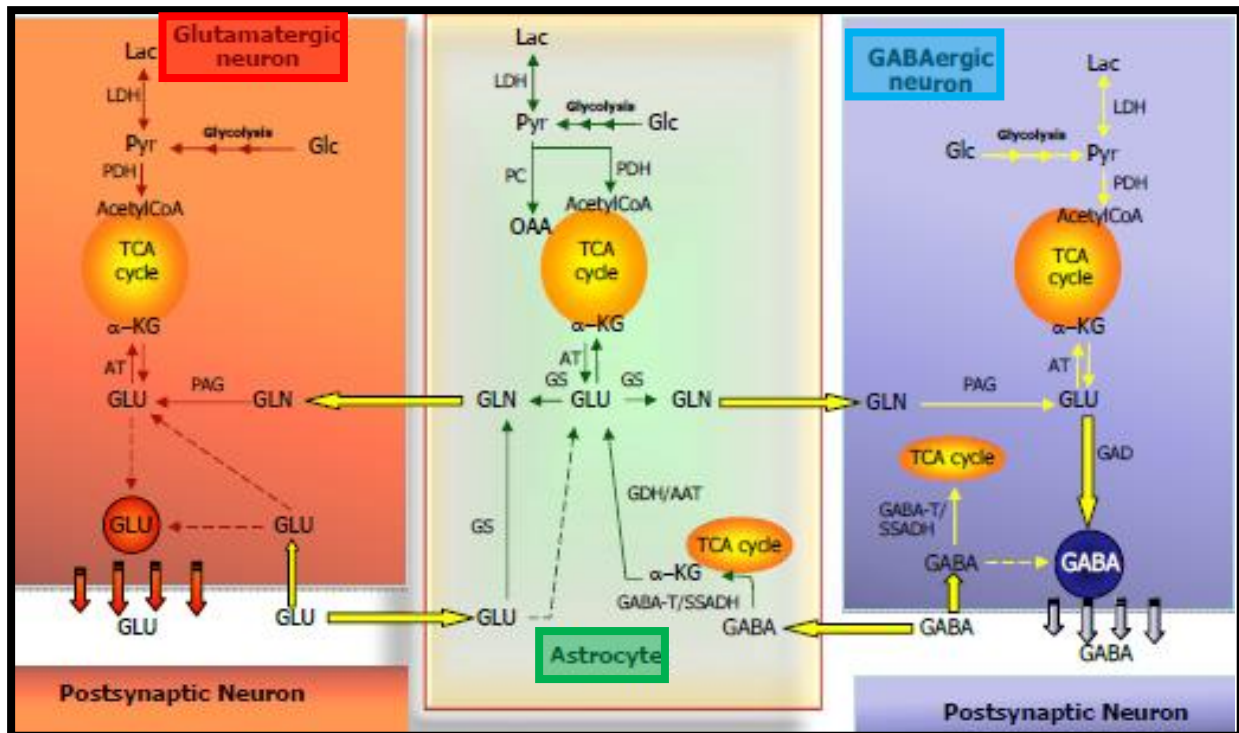


Figura 80: Relación entre astrocitos y neuronas glutamatergicas y GABAérgicas. Ciclo glutamato-GABA-glutamina e interacción con el TCA. Tomado de: *Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA* (Schousboe et al. 2013).

En *hipotálamo* se observa un aumento de glicina y descenso de glutamato, pero no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio. La explicación a ello podría estar en relación con alteraciones descritas en otras regiones cerebrales, por ejemplo en núcleo estriado dorsal, como se expone en las líneas superiores, donde pese a los daños de la HE, los mecanismos reguladores serían capaces de compensar tales alteraciones también en esta área cerebral (Leke et al. 2014a; Walls et al. 2014).

Así mismo, se estudiaron los *niveles plasmáticos* de aminoácidos, por su posible valor como marcadores de establecimiento de HE aguda-sobre-crónica y su correlación con los valores de los mismos en el SNC (Paniz et al. 2014). La principal fuente de aminoácidos en estados de cirrosis procede de la fragmentación de glicina

a nivel de los enterocitos y de las células renales. Esa glicina es sintetizada en músculo esquelético y en cerebro, resultado de la reacción entre amoníaco y glutamato, que consume aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), y que también es empleada para *detoxificar* el amoníaco (Figura 81) (Holeček 2015).

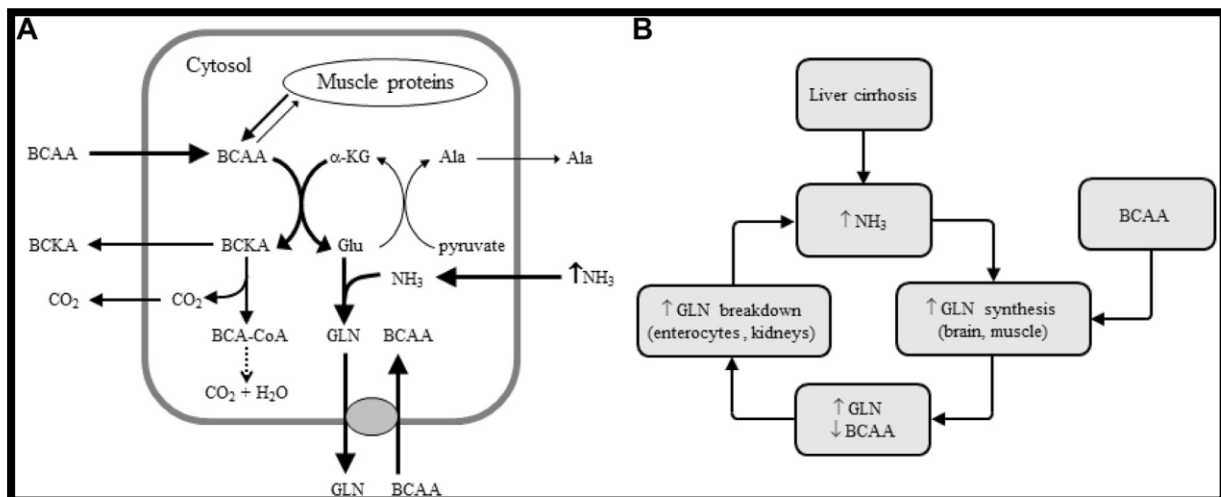


Figura 81: A/ Patogénesis del decremento de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en la cirrosis. B/ Círculo “vicioso” de la glicina. Tomado de: Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: Effects of variables leading to hepatic encephalopathy (Holeček 2015).

En nuestro estudio, es en plasma donde encontramos más diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, en contraposición al menor número hallado en núcleos cerebrales.

Parte de las alteraciones encontradas a nivel periférico podrían relacionarse con disfunciones en la BBB y en los sistemas de transporte de aminoácidos desde la periferia hasta el encéfalo. En la literatura científica se ha descrito la presencia de cambios en la BBB en pacientes humanos que asocian fracaso hepático y encefalopatía hepática, pero no en los que no padecían HE (Goldbecker et al. 2010; Butterworth 2013; Butterworth 2015; Ferenci et al. 2015). A nivel experimental, en

modelos de HE inducida con tioacetamida sobre ratas Wistar macho, se han descrito alteraciones en la composición lipídica de la membrana hematoencefálica cortical, concretamente una disminución en colesterol, fosfatidilserina, esfingomielina, ácidos grasos (poliinsaturados y monosaturados), y disminución en la fluidez de la membrana anular (Swapna et al. 2006; Ferenci et al. 2015). Aminoácidos como tirosina, fenilalanina y triptófano son precursores de neurotransmisores como dopamina, norepinefrina y serotonina, mientras otros como glutamato, aspartato, taurina y glicina son neurotransmisores propiamente ellos mismos (Ferenci et al. 2015); disfunciones en los sistemas de transporte específicos parecen ser importantes en la HE crónica y en el ACLF (Rothman et al. 2012; Vilstrup et al. 2014; Ferenci et al. 2015), como la limitación por los transportadores de la BBB o la competencia entre varios aa por un mismo transportador (James et al. 1978; Zavala De Ferrer et al. 2001). Como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones en la estructura y función de la BBB podrían relacionarse con tales disfunciones: menor fluidez de membrana, disminución de esfingomielina y fosfatidilserina, conllevando el desarrollo de modificaciones en la señalización celular (por ej. en la proteína quinasa C, PKC), la disminución de colesterol y disfunciones en el tráfico de sustancias, el aumento de la excitotoxicidad por glutamato, entre otras alteraciones (Swapna et al. 2006). Siendo así, se podría decir que la mayor expresión de diferencias entre los grupos de estudio para los aa determinados en plasma se debió, al menos en parte, a disfunciones de la BBB, alterando el transporte de aa periféricos al cerebro pero que sin embargo no afectarían de manera notable los niveles de los aminoácidos determinados en los núcleos cerebrales, seguramente por una función compensatoria a nivel astrocitario. Sin embargo, no se puede descartar que, las alteraciones a nivel del SNC fueron consecuencia de efectos del amoníaco y de la

inflamación, independientemente de la BBB, algo que ha de ser estudiado con más detalle en el futuro (Wright et al. 2014; Holecek 2015; Macías-Rodríguez et al. 2015; Parekh et al. 2015).

Tiene también trascendencia terapéutico-diagnóstica la *relación entre aa* expresada en forma de *ratio* (Holecek 2015): *en plasma*, se pueden establecer distintos ratios; uno de ellos es el *índice de Fischer*, consistente en el ratio molar de BCAA, valina más isoleucina y más leucina, entre aminoácidos aromáticos (AAA), fenilalanina más tirosina, con valores normales entre 3 y 3,5, para relacionar las concentraciones de BCAA y AAA (Holecek 2015). Otro, es el ratio glutamato/alanina, que es indicativo de la eficiencia de la transaminación y de la actividad de la glutamato piruvato transaminasa (GPT) en plasma, y en vista a los datos obtenidos en este trabajo, la transaminación fue menos eficiente en un hígado sometido a CM. Otros ratios establecidos fueron el ratio glutamato/taurina, donde se apreció un descenso estadísticamente significativo en el grupo sometido a CM, consecuencia del decremento de ácido glutámico y el aumento de taurina, y el ratio glicina/taurina, donde se observó una tendencia por la que se encontró aumentado en el grupo de CM, explicable principalmente por el aumento de glicina en plasma.

En los *ratios* establecidos en los *núcleos cerebrales*, cerebelo, núcleo estriado dorsal e hipotálamo, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, no obstante, sí se encontró una tendencia a que el ratio glicina/taurina fuera mayor en el grupo de CM, en los tres núcleos cerebrales estudiados.

Brevemente y a modo de resumen final, podemos afirmar que la colestasis extrahepática microquirúrgica es capaz de desencadenar un cuadro de fracaso

hepático agudo-sobre-crónico (Georgiev et al. 2008; Butterworth et al. 2009) que se caracterizaría por una serie de alteraciones sistémicas originadas por la hiperamonemia y un estado proinflamatorio sistémico, donde la vasculopatía y la circulación sanguínea hiperdinámica representan un papel crucial (Sawhney et al. 2016), desencadenando isquemia tisular e hipoxia celular. La célula aumentaría su catabolismo empleando la glucólisis anaerobia para producir energía, *efecto Warburg*, al no ser viable la fosforilación oxidativa fisiológica convencional. Esto generaría abundantes elementos *de deshecho* tales como ácido láctico, radicales libres de oxígeno, citoquinas proinflamatorias, entre otros, que perpetúan un estado patológico proinflamatorio y que contribuyen al desarrollo de fracaso multiorgánico, a saber, renal, hepático, cerebral, inmunológico, etc., y fallecimiento del individuo.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1/ La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata permite obtener un modelo experimental de insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica en el cual estudiar la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica. Este modelo experimental cursa con la clínica propia de la insuficiencia hepática crónica así como con ascitis y síndrome hepatorenal.

2/ El estudio funcional de las arterias cerebrales en este modelo experimental demuestra la existencia de una vasculopatía producida fundamentalmente por un desequilibrio de mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores. Los resultados obtenidos indican la presencia de un incremento en la formación global de elementos vasodilatadores (NO, PGI₂), así como un descenso o ausencia de modificación compensatoria del estado de homeostasis, en la síntesis de factores vasoconstrictores (TXA₂, ET-1). Conjuntamente, todo ello desencadena un aumento en la vasodilatación de la arteria cerebral media, el cual podría colaborar en el desarrollo y mantenimiento del estado de circulación hiperdinámica sistémico, a nivel cerebral, observado en esta patología.

3/ En este modelo experimental se produce un incremento de las concentraciones plasmáticas de aminoácidos glucogénicos, en particular glicina, alanina y serina. A su vez, en el sistema nervioso central, la disminución de GABA, L-Glutámico y L-Aspártico caracteriza este tipo de encefalopatía hepática.

Conclusiones

4/ Las alteraciones cerebrales tanto vasculares como metabólicas demostradas en este estudio contribuyen a una mejor interpretación etiopatogénica de la encefalopatía hepática aguda-sobre-crónica experimental, siendo necesarios nuevos ensayos clínicos sobre esta área de conocimiento para continuar la caracterización de esta entidad nosológica.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Khalek EE, El-fakhry A, Helaly M, Hamed M, Elbaz O. Systemic inflammatory response syndrome in patients with liver cirrhosis. *Arab J Gastroenterol* 2011; 12: 173–177.
- Ábrahám S, Szabó A, Kaszaki J, Varga R, Eder K, Duda E, Lázár G, Tiszlavicz L, Boros M, Lázár G Jr. Kupffer cell blockade improves the endotoxin-induced microcirculatory inflammatory response in obstructive jaundice. *Shock* 2008; 30:69-74.
- Abraldes JG, Pasarín M, García-Pagán JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2006;12: 6577-84.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim* 2005; 54:155–161.
- Alaish, Smith AD, Timmons J, Greenspon J, Eyvazzadeh D, Murphy E, Shea-Donahue T, Cirimotich S, Mongodin E, Zhao A, Fasano A, Nataro JP, Cross A. Cross A. Gut microbiota, tight junction protein expression, intestinal resistance, bacterial translocation and mortality following cholestasis depend on the genetic background of the host. *Gut microbes* 2013; 4: 292–305.
- Aldridge DR, Tranah EJ, Shawcross, DL. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: Role of ammonia and systemic inflammation. *J Clin Exp Hep* 2015; 5: S7–S20.
- Aller MA, Lorente L, Alonso MS, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 10-14.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2004a; 24:442-47.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Durán M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg* 2004b;17: 99-104.
- Aller MA, Arias JL, Arias JI, Sánchez-Patán F, Arias J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. *Med Hypotheses* 2006; 68: 202–209.
- Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibr & tissue repair* 2008;1: 6.
- Aller MA, Nava MP, Méndez M, Vergara P, Arias JL. *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA, and Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009a.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JL, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int* 2009b; 29: 1132-40.

- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010a; 22: 651-61.
- Aller, M. Prieto I, Argudo S, de Vicente F, Santamaría L, de Miguel MP, Arias JL, Arias J. The interstitial lymphatic peritoneal mesothelium axis in portal hypertensive ascites: when in danger, go back to the sea. *Int J Inflam* 2010; 148689.
- Aller MA, Arias N, Prieto I, Argudo S, Gilsanz C, Llorente L, Arias JI, Arias J. A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol* 2012; 4: 199-208.
- Aller MA, Arias JI, Prieto I, Gilsanz C, Arias A, Yang H, Arias J. Surgical inflammatory stress: the embryo takes hold of the reins again. *Theor Biol Med Model* 2013; 10: 6.
- Altamura C, Maes M, Dai J, Meltzer HY. b1995. Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995; 5: 71-75.
- Andresen J, Shafi NI, Bryan RM. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 2006; 100: 318-327.
- Ara C, Esrefoglu M, Polat A, Isik B, Aladag M, Gul M, Ay S, Tekerleklioglu MS, Yilmaz S. The effect of caffeic acid phenethyl ester on bacterial translocation and intestinal damage in cholestatic rats. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1754-60.
- Arias JL, Aller MA, Sánchez-Patán F, Arias J. The inflammatory bases of hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1297-1310.
- Arroyo V, Moreau R, Jalan R, Ginès P. 2015. Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome that will re-classify cirrhosis. *J Hepatol* 2015; 62: S131-S143.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. 2009. Bile duct ligation in rats: A reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol* 2009;15: 121-123.
- Bak LK, Waagepetersen HS. Role of branched chain amino acids in cerebral ammonia homeostasis related to hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 209-215.
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Ceconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471.
- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000; 127: 243-249.
- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23: 235.
- Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis:

- pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013; 33: 31-39.
- Bernal W, Jalan R, Quaglia A, Simpson K, Wendon J, Burroughs A. Acute-on-chronic liver failure. *Lancet* 2015; 386: 1576–1587.
- Bhimani EK, Serracino-Inglott F, Sarela AI, Batten JJ, Mathie T. Hepatic and mesenteric nitric oxide synthase expression in a rat model of CCl₄-induced cirrhosis. *J Surg Res* 2003; 113: 172–178.
- Blanco-Rivero J, Balfagón G, Ferrer M. Orchidectomy modulates α 2-adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A₂ formation. *J Vasc Res* 2005a; 43: 101–108.
- Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2005b; 46: 107–112.
- Blanco-Rivero J, Aller MA, Arias J, Ferrer M, Balfagón G. 2009. Long-term portal hypertension increases the vasodilator response to acetylcholine in rat aorta: role of prostaglandin I₂. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117: 365–374.
- Blanco-Rivero J, Márquez-Rodas I, Sastre E, Cogolludo A, Pérez-Vizcaíno F, del Campo L, Paz Nava M, G Balfagón. Cirrhosis decreases vasoconstrictor response to electrical field stimulation in rat mesenteric artery: role of calcitonin gene-related peptide. *Exp Physiol* 2011; 96: 275–286.
- Boak L, Chin-Dusting LPF. Hypercholesterolemia and Endothelium Dysfunction: Role of Dietary Supplementation as Vascular Protective Agents. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2: 45–52.
- Boeckxstaens GE, Pelckmans IA. Nitric Oxide and the Non-Adrenergic Non Cholinergic Neurotransmission. *Comp Biochem Physiol* 1997; 118A, 4: 925-937.
- Bolognesi M, Di Pascoli M, Verardo A, Gatta A. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2555–2563.
- Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol* 2015; 62: S121–S130.
- Brian JE, Heistad DD, Faraci FM. Effect of carbon monoxide on rabbit cerebral arteries. *Stroke* 1994; 25: 639-43–4.
- Brian JE, Faraci FM, Moore SA. COX-2-dependent delayed dilatation of cerebral arterioles in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2023-H2029.
- Brunelli L, Campagna R, Airoidi L, Cauli O, Llansola M, Boix J, Felipe V, Pasyorelli R. Exploratory investigation on nitro- and phospho-proteome cerebellum changes in hyperammonemia and Hepatic encephalopathy rat models. *Metab Brain Dis* 2012; 27: 37–49.

- Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: Current and future. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 327–331.
- Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT; Members of the ISHEN Commission on Experimental Models of HE. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009; 29: 783-8.
- Butterworth RF. The liver-brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 522–8.
- Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: the concept of synergism revisited. *Metab Brain Dis* 2015; 31: 1211-1215.
- Cahill PA, Foster C, Redmond EM, Gingalewski C, Wu Y, Sitzman JV. Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* 1995; 22: 598–606.
- Cahill PA, Redmond EM, Sitzman JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 273–293.
- Cauli O, Mansouri MT, Agustí A, Felipo V. Hyperammonemia Increases GABAergic Tone in the Cerebellum but Decreases It in the Rat Cortex. *Gastroenterology* 2009a; 136: 1359–1367..
- Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, el Mili N, Boix J, Agustí A, Felipo V. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2009b; 24: 69–80.
- Cauli O, González-Usano A, Agustí A, Felipo V. Differential modulation of the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway by distinct neurosteroids in cerebellum in vivo. *Neurosci* 2011; 190: 27–36.
- Cauli O, Llansola M, Agustí A, Rodrigo R, Hernández-Rabaza V, Rodrigues TB, López-Larrubia P, Cerdán S, Felipo V. Cerebral oedema is not responsible for motor or cognitive deficits in rats with hepatic encephalopathy. *Liver Int* 2014; 34: 379–387.
- Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2009; 51: 475-82.
- Chakrabarti S, Jiang Y, Davidge ST. Neuronal nitric oxide synthase regulates endothelial inflammation. *J Leukoc Biol* 2012; 91: 947–56.
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. *Science* 2002; 296: 539–541.
- Choi IY, Lee P, Wang WT, Hui P, Wang X, Brooks WM, Michaelis EK. Metabolism changes during aging in the hippocampus and striatum of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) transgenic mice. *Neurochem Res* 2014; 39: 446–455.
- Chuang CL, Huang HC, Chang CC, Lee SD. Lipopolysaccharide enhanced renal vascular response to endothelin-1 through ETA overexpression in portal

- hypertensive rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 30: 199–207.
- Cilliers K, Page BJ. Review of the Anatomy of the Distal Anterior Cerebral Artery and Its Anomalies. *Turk Neurosurg*, 2016; 26: 653–661.
- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut* 1998; 42: 293-9.
- Coltart I, Tranah TH, Shawcross DL. Inflammation and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 2013; 15;536:189-96.
- Cooper AJL, Jeitner TM. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules* 2016; 6:16.
- Cooper AJL, Shurubor YI, Dorai T, Pinto JT, Isakova EP, Deryabina YI, Denton TT, Krasnikov BF. ω -Amidase: An underappreciated, but important enzyme in l-glutamine and l-asparagine metabolism; relevance to sulfur and nitrogen metabolism, tumor biology and hyperammonemic diseases. *Amino Acids* 2016; 48: 1–20.
- Corcuera Pindado MT, Nava Hidalgo MP, Angulo burgos A, Aller Reyero MA, Gómez Aguado F, Casado Fariñas I, Alonso Martín MJ, Jaime Pérez A. 2005. Remodelación esplácnica secundaria a hipertensión portal prehepática experimental. *An Med Interna (Madrid)* 2005; 22: 317–322.
- Daugherty A, Cassis L. Angiotensin II-mediated development of vascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 117–120.
- Dávila JC, Andreu MJ, Real MA, Puellas L. Mesencephalic and diencephalic afferent connections to the thalamic nucleus rotundus in the lizard, *Psammmodromus algirus*. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 267–282.
- Davis CM, Siler DA, Alkajed NJ. EDHF in the Brain: Influence of Sex, Vessel Size and Disease State. *Womens Health (Lond)* 2011; 7: 293–303.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19345–50.
- De las Heras N, Aller MA, Martín-Fernández B, Miana M, Ballesteros S, Regadera J, Cachafeiro V, Arias J, Lahera V. A wound-like inflammatory aortic response in chronic portal hypertensive rats. *Mol Immunol* 2012; 51: 177–187.
- De Queiroz DB, Sastre E, Caracuel L, Callejo M, Xavier FE, Blanco-Rivero J, Balfagón G. Alterations in perivascular innervation function in mesenteric arteries from offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 4699-4713.
- Del Campo L, Blanco-Rivero J, Balfagón G. Fenofibrate increases neuronal vasoconstrictor response in mesenteric arteries from diabetic rats: Role of noradrenaline, neuronal nitric oxide and calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharm* 2011; 666:142–149.

- DeWitt DS, Kong DL, Lyeth BG, Jenkins LW, Hayes RL, Wooten ED, Prough DS. *londJ Neurotrauma* 1988; 5: 303-U72.
- Dhanda S, Sandhir R. Role of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in behavioral alterations observed in rodent model of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2015; 286: 222–235.
- Díaz-Gómez D, Jover M, del-Campo JA, Galindo A, Manuel Romero-Gómez M. Experimental models for hepatic encephalopathy. *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 536–41.
- Didion SP, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms that produce nitric oxide-mediated relaxation of cerebral arteries during atherosclerosis. *Stroke* 2001; 32: 761-766.
- Di Marco E, Jha JC, Sharma A, Wilkinson-Berka JL, Jandeleit-Dahm KA, de Haan JB. Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? *Clin Sci (Lond)* 2015; 129: 199–216.
- Di Marco LY, Farkas E, Martin C, Venneri A, Frangi AF. Is vasomotion in cerebral arteries impaired in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2015a; 46: 35–53.
- Di Marco LY, Venneri A, Farkas E, Evans PC, Marzo A, Frangi AF. Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease - A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiol Dis* 2015b; 82: 593–606.
- Duchini A. The role of central nervous system endothelial cell activation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Med Hypoth* 1996; 46: 239–244.
- El-Mili N, Rodrigo R, Naghizadeh B, Cauli O, Felipe V. Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J. Neurochem* 2008; 106: 1440–1449.
- Engin A, Bozkurt BS, Altan N, Memis L, Bukan N. Nitric oxide-mediated liver injury in the presence of experimental bile duct obstruction. *World J Surg* 2003; 27: 253–255.
- Esrefoglu M, Gül M, Emre MH, Polat A, Selimoglu MA. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1951–1956.
- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res* 1990; 66: 8–17.
- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 1998; 78: 53–97.
- Féletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117: 139–155
- Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 259–279.
- Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev*

- Neurosci 2013; 14: 851–8.
- Ferenci P, Litwiny T, Seniowy J, Czlonkowska A. Encephalopathy in wilson disease: Copper toxicity or liver failure? J Clin Exp Hepatol 2015; 5: S88–S95.
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. Hepatology 2002; 35: 716–721.
- Ferguson JW, Dover AR, Cruden NLM, Hayes PC, Newby. Inducible nitric oxide synthase activity contributes to the regulation of peripheral vascular tone in patients with cirrhosis and ascites. Gut 2006; 55: 542–6.
- Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. Gastroenterology 2008; 134: 1655–1669.
- Gambaryan S, Tsikas D. A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? Amino Acids 2015; 47: 1779–1793.
- García-Domínguez J, Aller MA, García C, de Vicente F, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Vara E, Arias J. Splanchnic Th2 and Th1 cytokine redistribution in microsurgical cholestatic rats. J Surg Res 2010; 162: 203–212.
- García-Moreno LM, Aller MA, Conejo MA, Martín FR, Arias J, Arias JL. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. Hepatol Res 2002; 24: 275–281.
- García-Moreno LM, Conejo MA, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. Braz J Med Biol Res 2005; 38: 127–132.
- Gatta A., Bolognesi M, Merkel C. Vasoactive factors and hemodynamic mechanisms in the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. Mol Aspects Med 2008; 29: 119–129.
- Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. Int J Exp Pathol 2008; 89: 251-63.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. Br J Surg 2008; 95: 646-56.
- Goldbecker A, Buchert R, Berding G, Bokemeyer M, Lichtinghagen R, Wilke F, Ahl B, Weissenborn K. Blood-brain barrier permeability for ammonia in patients with different grades of liver fibrosis is not different from healthy controls. J Cereb Blood Flow Metab 2010; 30: 1384–93.
- González-Usano A, Cauli O, Agustí A, Felipe V. Hyperammonemia alters the modulation by different neurosteroids of the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway through NMDA- GABAA- or sigma receptors in cerebellum in vivo. J Neurochem 2013; 125: 133–143.

- Gossard AA. Care of the cholestatic patient. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 331-344.
- Guyton AC, Hall TE. *Tratado de Fisiología Médica*. McGraw Hill 2003.
- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabejdar-Maralani P, Shafaroodi H, Borhani AA, Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 307-13.
- Han Y, Onori P, Meng F, DeMorrow S, Venter J, Francis H, Franchitto A, Ray D, Kennedy L, Greene JF, Renzi A, Mancinelli R, Gaudio E, Glaser S, Alpini G. Prolonged exposure of cholestatic rats to complete dark inhibits biliary hyperplasia and liverfibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 307: G894-904.
- Hardebo JE, Suzuki N, Owman C. Dynorphin B is present in sensory and parasympathetic nerves innervating pial arteries. *J Auton Nerv Syst* 1994; 47: 171-176.
- Hassel B. Carboxylation and Anaplerosis in Neurons and Glia. *Mol Neurobiol* 2000; 22: 21-40.
- Hernandez Caler R, Rubio Sanz MJ, Riñones Mena E, Laguna Perez P, López Martínez JL, Aldea Martínez J. Hallazgos radiológicos en la disección arterial carotídea espontánea. Papel del radiólogo en esta entidad. 31 Congreso Sociedad Española de Radiología Médica 2012; S1317: 1-29.
- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2010; 139: 1481-1496.
- Holecek M. Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: Effects of variables leading to hepatic encephalopathy. *Nutrition* 2015; 31: 14-20.
- Hollenberg SM, Waldman B. The Circulatory System in Liver Disease. *Crit Care Clin* 2016; 32: 331-342.
- Hollingsworth KG, Jones DL, Taylor R, Frith J, Blamire AM, Newton JL. Impaired cerebral autoregulation in primary biliary cirrhosis: implications for the pathogenesis of cognitive decline. *Liver Int* 2010; 30: 878-85.
- Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 861-82.
- Hosseini N, Alaei H, Zarrindast MR, Nasehi M, Radahmadi M. Cholestasis progression effects on long-term memory in bile duct ligation rats. *Adv Biomed Res* 2014; 3 :215.
- Hou X, Gobeil F Jr, Peri K, Speranza G, Marrache AM, Lachapelle P, Roberts J 2nd, Varma DR, Chemtob S, Ellis EF. Augmented Vasoconstriction and Thromboxane Formation by 15-F2t-Isoprostane (8-Iso-Prostaglandin F2α) in Immature Pig Periventricular Brain Microvessels. *Stroke* 2000; 31: 516-525.
- Hsu SJ, Wang SS, Hsin IF, Lee FY, Huang HC, Huo TI, Lee WS, Lin HC, Lee SD. Green tea polyphenol decreases the severity of portosystemic collaterals and

- mesenteric angiogenesis in rats with liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126: 633–644.
- Huang LT, Tiao MM, Tain YL, Chen CC, Hsieh CS. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res*, 65: 176–180.
- Imam MH, Gossard AA, Sinakos E, Lindor KD. Pathogenesis and management of pruritus in cholestatic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1150–8.
- Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: From the patient to the molecule. *Hepatology* 2006; 43: 121–131.
- Jacob G, Nassar N, Hayam G, Ben-Haim S, Edoute Y, Better OS, Bomzon A. Cardiac function and responsiveness to beta-adrenoceptor agonists in rats with obstructive jaundice. *Am J Physiol* 1993; 265: G314-20.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 331–343.
- Jalan R, Williams R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif* 2002; 20: 252-61.
- Jalan R. Acute liver failure: Current management and future prospects. *J Hepatol* 2005; 42: 69–75.
- Jalan R. Acute-on-chronic liver failure: from concept to a new syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2011; 17: 152.
- Jalan R, Pavesi M, Saliba F, Amorós A, Fernandez J, Holland-Fischer P, Sawhney R, Mookerjee R, Caraceni P, Moreau R, Ginès P, Durand F, Angeli P, Alessandria C, Laleman W, Trebicka J, Samuel D, Zeuzem S, Gustot T, Gerbes AL, Wendon J, Bernardi M, Arroyo V; CANONIC Study Investigators; EASL-CLIF Consortium. The CLIF Consortium Acute Decompensation score (CLIF-C ADs) for prognosis of hospitalised cirrhotic patients without acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 2015; 62: 831-40
- Javan R, Herrin D, Tangestanipoor A. Understanding Spatially Complex Segmental and Branch Anatomy Using 3D Printing. Liver, Lung, Prostate, Coronary Arteries, and Circle of Willis. *Acad Radiol* 2016; 23: 1183–1189.
- Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, Candela A, Compañ A, Esteban A, Cauli O, Ausó E, Rodríguez E, Gutiérrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Pérez-Mateo M. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 1257–1266.
- Jüngst C, Lammert F. Cholestatic liver disease. *Dig Dis* 2013; 31: 152–154.
- Kaler B, Karram T, Morgan WA, Bach PH, Yousef IM, Bomzon A. Are bile acids involved in the renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats. *Ren Fail* 2004; 26: 507–516.
- Katusi ZS, Marshall JJ, Kontos HA, Vanhoutte PM. Similar responsiveness of smooth

- muscle of the canine basilar artery to EDRF and nitric oxide. *Am J Physiol* 1989; 257: H1235–H1239.
- Katz JJ, Mandell MS, House RM, Bilir BM, Barton B, Zamudio S. Cerebral blood flow velocity in patients with subclinical portal-systemic encephalopathy. *Anesth Analg* 1998; 86: 1005–1009.
- Krishnamoorthy-Natarajan G, Koidet M. BK Channels in the Vascular System. *Int Rev Neurobiol* 2016; 128: 401-438
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65: 305-311.
- Kramer HJ. 1997. Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron* 1997; 77: 1–12.
- Krause DN, Duckles SP, Gonzales RJ. Local estrogenic/androgenic balance in the cerebral vasculature. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 203: 181–186.
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Laleman W. Role of vasoactive substances and cellular effectors in the pathophysiology of cirrhotic portal hypertension: The past, the present and the future - Georges Brohée lecture -. *Acta Gastroenterol Bel* 2009; 72: 9–16.
- Lee JG. Diagnosis and management of acute cholangitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 533-41.
- Lee KC, Yang YY, Huang YT, Lee FY, Hou MC, Lin HC, Lee SD. Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 45–55.
- Lee RH, Geenes VL, Williamson C. Primum non nocere: Stillbirth rate in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212: 414.
- Leke R, Bak LK, Iversen P, Sørensen M, Keiding S, Vilstrup H, Ott P, Portela LV, Schousboe A, Waagepetersen HS. Synthesis of neurotransmitter GABA via the neuronal tricarboxylic acid cycle is elevated in rats with liver cirrhosis consistent with a high GABAergic tone in chronic hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 2011; 117: 824–832.
- Leke R, Oliveira DL, Forgiarini LF, Escobar TDC, Hammes TO, Meyer FS, Keiding S, Silveira TR, Schousboe A. Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 187–192.
- Leke R, Silveira TR, Escobar TDC, Schousboe A. Expression of glutamate decarboxylase (GAD) mRNA in the brain of bile duct ligated rats serving as a model of hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 2014; 39: 605–611.
- Leke R, Escobar TDC, Rao KV, Silveira TR, Norenberg MD, Schousboe A. Expression of glutamine transporter isoforms in cerebral cortex of rats with chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2015; 88: 32–37.

- Leon R, Wu H, Jin Y, Wei J, Buddhala C, Prentice H, Wu JY. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. *J Neurosci Res* 2009; 87: 1185-94.
- Leonhardt J, Kuebler JF, Turowski C, Tschernig T, Geffers R, Petersen C. Susceptibility to experimental biliary atresia linked to different hepatic gene expression profiles in two mouse strains. *Hepatol Res* 2010; 40: 196-203.
- Li MK, Crawford JM. The Pathology of Cholestasis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 21–42.
- Li Y, Duckles SP. Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol* 1992; 210: 23-30.
- Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6: 19.
- Lipsett PA, Pitt HA. Acute Cholangitis. *Sur Clin North America* 1990; 70: 1297-1312
- Liu X, Gao Z, Xiong H, Ghista D, Ren L, Zhang H, Wu W, Huang W, Hau WK. Three-dimensional hemodynamics analysis of the circle of Willis in the patient-specific nonintegral arterial structures. *Biomech Model Mechanobiol* 2016; 15: 1439-1456.
- Llamas MA, Aller MA, Marquina D, Nava MP, Arias J. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes increases in chronic portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2244-54.
- Llansola M, Montoliú C, Coauli O, Hernández-Rabaza V, Agustí A, Cabrera-Pastor A, Giménez-Garzó C, González-Usano, Felipe V. Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 151–154.
- Lowry OH, Rosebrough A., Farra AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.
- Macías-Rodríguez RU, Duarte-Rojo A, Cantú-Brito C, Sauerbruch T, Ruiz-Margáin A, Trebicka J, Green-Gómez M, Díaz Ramírez JB, Sierra Beltrán M, Uribe-Esquivel M, Torre A. Cerebral haemodynamics in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Liver Int* 2015; 35: 344–52.
- Marques TG, Chaib E, da Fonseca JH, Lourenço AC, Silva FD, Ribeiro MA Jr, Galvão FH, D'Albuquerque LA. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras* 2012; 27: 589–94.
- Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1992; 307: 287–293.
- Martin PY, Ohara M, Gines P, Xu DL, St John J, Niederberger M, Schrier RW. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 1998; 101: 235–242.

- Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Rychlicki C, Agostinelli L, Trozzi L, De Minicis S, Benedetti A. Clinical implications of novel aspects of biliary pathophysiology. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 238–44.
- Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 2001; 32: 2143–2148.
- Miguéns M, Botreau F, Olías O, Del Olmo N, Coria SM, Higuera-Matas A, Ambrosio E. Genetic differences in the modulation of accumbal glutamate and γ -amino butyric acid levels after cocaine-induced reinstatement. *Addict Biol* 2013; 18: 623–32.
- Miñano C, Garcia-Tsao G. Portal Hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 681–695.
- Moezi L, Dehpour AR. Cardiovascular abnormalities in obstructive cholestasis: The possible mechanisms. *Liver Int* 2013; 33: 7–15.
- Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 217–252.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 61–74.
- Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, Rivera F, Arroyo V. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1996; 24: 1481–1486.
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V; CANONIC Study Investigators of the EASL–CLIF Consortium. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013; 144: 1426–1437.
- Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976; 260: 617–619.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977; 41: 19–26.
- Nagai H, Kato A, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Furukawa K, Nozawa S, Yoshitomi H, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Suda K, Yoshioka I, Miyazaki M. Endothelin-1 Aggravates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury During Obstructive Cholestasis in Bile Duct Ligated Mice. *J Surg Res* 2010; 162: 46–53.
- Nakamura K, Tanoue A. Etiology of biliary atresia as a developmental anomaly: Recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013; 20: 459–464.
- Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2014; 548:

20-37.

- O'Hara SP, Tabibian JH, Splinter PL, LaRusso NF. The dynamic biliary epithelia: Molecules, pathways, and disease. *J Hepatol* 2013; 58: 575–582.
- Obrietan K, Van den Pol AN. GABAB receptor-mediated regulation of glutamate-activated calcium transients in hypothalamic and cortical neuron development. *J Neurophysiol* 1999; 82: 94-102.
- Oguz S, Kanter M, Erboga M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol* 2012; 43: 151-159.
- Okahara K, Sun B, Kambayashi J-i. Upregulation of Prostacyclin Synthesis Related Gene Expression by Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1922-1926.
- Olive MF. Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. *Amino Acids* 2002; 23: 345–357.
- Olsen GM, Sonnewald U. Glutamate: Where does it come from and where does it go? *Neurochem Int* 2015; 88: 47–52.
- Ospina JA, Duckles SP, Krause DN. 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H241-H250.
- Ott P, Vilstrup H. Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 901–911.
- Palacios N, Manonelles P, Blasco R, Bonafonte LF, Gaztañaga T, Manuz B, Villegas JA. Ayudas ergogénicas nutricionales para personas que realizan ejercicio físico. *Arch Med Deporte* 2011; 29: 5–80.
- Palomero-Gallagher N, Zilles K. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: A review. *Arch Biochem Biophys* 2013; 536: 109–121.
- Paniz LG, Calcagnotto ME, Pandolfo P, Machado DG, Santos GF, Hansel G, Almeida RF, Bruch RS, Brum LM, Torres FV, de Assis AM, Rico EP, Souza DO. Neuroprotective effects of guanosine administration on behavioral, brain activity, neurochemical and redox parameters in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 645-54.
- Parekh PJ, Balart LA. Ammonia and Its Role in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis* 2015; 19: 529–537.
- Park MJ, Aja S, Li Q, Degano AL, Penati J, Zhuo J, Roe CR, Ronnett GV. Anaplerotic triheptanoin diet enhances mitochondrial substrate use to remodel the metabolome and improve lifespan, motor function, and sociability in MeCP2-null mice. *PLoS One* 2014;9: e109527.
- Park SM. The crucial role of cholangiocytes in cholangiopathies. *Gut Liver* 2012; 6: 295–304.

- Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2009; 2: 4.
- Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 181-94.
- Petersen C, Davenport M. Aetiology of biliary atresia: what is actually known? *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 128.
- Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med*. 2011; 2011: 823525.
- Polimeno L, Azzarone A, Zeng QH, Panella C, Subbotin V, Carr B, Bouzahzah B, Francavilla A, Starzl TE. Cell Proliferation and Oncogene Expression After Bile Duct Ligation in the Rat: Evidence of a Specific Growth Effect on Bile Duct Cells. *Hepatology* 1995; 21: 1070-8.
- Pollheimer MJ, Fickert P, Stieger B. Chronic cholestatic liver diseases: Clues from histopathology for pathogenesis. *Mol Aspects Med* 2014; 37: 35-56.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825–832.
- Rahimi RS, Rockey DC. Complications and outcomes in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 204-209.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. Brain edema in acute liver failure: mechanisms and concepts. *Metab Brain Dis* 2014a; 29: 927–936.
- Rama Rao KV, Norenberg MD. Glutamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: The Trojan horse hypothesis revisited. *Neurochem Res* 2014b; 39: 593–598.
- Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N, Sen B, Khosla R, Sarin SK. From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver cancer* 2013; 2: 367–283.
- Rehm J, Shield KD. Global alcohol-attributable deaths from cancer, liver cirrhosis, and injury in 2010. *Alcohol Res* 2013; 35: 174-183.
- Risør LM, Bendtsen F, Møller S. Immunologic, hemodynamic, and adrenal incompetence in cirrhosis: impact on renal dysfunction. *Hepatol Int* 2015; 9: 17–27.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2010; 139: 675–684.
- Rodriguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol* 2003; 2: 150–158.
- Romero-Gómez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol*

2015; 62: 437–447.

Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, Pinzani M. Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. *Gut* 2013; 62: 1234-1241.

Rothman DL, De Feyer HM, Maciejewski PK, Behar KL. Is there in vivo evidence for amino acid shuttles carrying ammonia from neurons to astrocytes? *Neurochem Res* 2012; 37: 2597-2612.

Rubanyi GM, Parker LH. Endothelins. *FASEB J* 1991; 5: 2713–2720.

Russo FP, Parola M. Stem cells in liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26: 35–45.

Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Corcuera MT, Casado I, Gómez-Aguado F, Aller MA, Cruz A, Alonso MJ, Arias J. Biliary fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2008; 28: 361-6.

Sarin SK, Choudhury A. Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 131-149.

Sastre E, Márquez-Rodas I, Blanco-Rivero J, Balfagón G. Inervación perivascular de la arteria mesentérica superior: implicaciones fisiopatológicas. *Rev Neurol* 2010; 50: 727–737.

Sastre E, Balfagón G, Revuelta-López E, Aller MA, Nava MP, Arias J, Blanco-Rivero J. Effect of short- and long-term portal hypertension on adrenergic, nitrergic and sensory functioning in rat mesenteric artery. *Clin Sci (Lond)* 2011; 122: 337–348.

Sastre E, Caracul L, Blanco-Rivero J, Callejo M, Xavier FE, Balfagón G. Biphasic Effect of Diabetes on Neuronal Nitric Oxide Release in Rat Mesenteric Arteries. *Plos One* 2016a; 11: e0156793.

Sastre E, Caracul L, Prieto I, Llénenes P, Aller MA, Arias J, Balfagón G, Blanco-Rivero J. Decompensated liver cirrhosis and neural regulation of mesenteric vascular tone in rats: role of sympathetic, nitrergic and sensory innervations. *Sci Rep* 2016b; 6: 31076.

Sawhney R, Holland-Fischer P, Rosselli M, Mookerjee RP, Agarwal B, Jalan R. Role of ammonia, inflammation and cerebral oxygenation in brain dysfunction of acute on chronic liver failure patients. *Liver Transpl* 2016; 22:732-42.

Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 1–11.

Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *Adv Neurobiol* 2014; 11: 13–30.

Sen S, Williams R, Jalan R. The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure. *Liver* 2002; 22: 5-13.

Sherlock S. Diseases of the Liver and Biliary System. Sherlock S. Blackwell Scientific

- Publications 1989; 8^a Ed 13: 248-272.
- Sonnenwald U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - Where do all the carbons go? *J Neurochem* 2014; 131: 399–406.
- Suárez V, Puerta A, Santos LF, Pérez JM, Varón A, Botero RC. Portal hypertensive biliopathy: A single center experience and literature review. *World J Hepatol* 2013; 5: 137–144.
- Swapna I, SathyaSaiKumar KV, Murthy ChRK, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B. Changes in cerebral membrane lipid composition and fluidity during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 2006; 98: 1899–1907.
- Syal G, Fausther M, Dranoff JA. Advances in cholangiocyte immunobiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G1077-1086.
- Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 26–42.
- Tannuri AC, Coelho MC, de Oliveira Gonçalves J, Santos MM, Ferraz da Silva LF, Bendit I, Tannuri U. Effects of selective bile duct ligation on liver parenchyma in young animals: Histologic and molecular evaluations. *J Pediatr Surg* 2012; 47: 513–522.
- Tao J, Tu YT, Li JW, Feng AP, Huang CZ, Wu Y, Shen GX. Endogenous production of nitric oxide contributes to proliferation effect of vascular endothelial growth factor-induced malignant melanoma cell. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31: 94–99.
- Thabut D, Tazi KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller MA, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guichard C. High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46: 1893-1906.
- Theodorakis NG, Wang YN, Skill NJ, Metz MA, Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. The role of nitric oxide synthase isoforms in extrahepatic portal hypertension: Studies in gene-knockout mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1500–1508.
- Tivers MS, Handel I, Gow AG, Lipscomb VJ, Jalan R, Mellanby RJ. Hyperammonemia and systemic inflammatory response syndrome predicts presence of hepatic encephalopathy in dogs with congenital portosystemic shunts. *PLoS One* 2014; 9: e82303.
- Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 713–738.
- van den Pol AN, Gao XB, Patrylo PR, Ghosh PK, Obrietan K. Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 10749–10761.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn C, van Loo D, Van Hoorebeke L, Segers P, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Vascular corrosion casting: analyzing wall

- shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest* 2010; 90: 1558-1572.
- Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 527–536.
- Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, Weissenborn K, Wong P. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study Of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology* 2014; 60: 715–735.
- Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U. The glutamine-glutamate/GABA cycle: function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of Interference with GABA metabolism. *Neurochem Res* 2014; 40: 402–409.
- Wiest R. Splanchnic and systemic vasodilation: the experimental models. *J Clin Gastroenterol* 2007, 41: S272-87.
- Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478–491.
- Wong WT, Tian XY, Huang Y. Endothelial dysfunction in diabetes and hypertension: cross talk in RAS, BMP4, and ROS-dependent COX-2-derived prostanoids. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 61: 204–214.
- Wright G, Jalan R. Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 95–110.
- Wright G, Vairappan B, Stadlbauer V, Mookerjee RP, Davies NA, Jalan R. Reduction in hyperammonaemia by ornithine phenylacetate prevents lipopolysaccharide-induced brain edema and coma in cirrhotic rats. *Liver Int* 2012; 32: 410–419.
- Wright G, Sharifi Y, Jover-Cobos M, Jalan R. The brain in acute on chronic liver failure. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 965–973.
- Xavier FE, Xavier FE, Blanco-Rivero J, Ferrer M, Balfagón G. Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: Interaction between EP1 and TP receptors. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 1787–1795.
- Xavier FE, Blanco-Rivero J, Sastre E, Badimón L, Balfagón G. Simultaneous inhibition of TXA₂ and PGI₂ synthesis increases NO release in mesenteric resistance arteries from cirrhotic rats. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 283-292.
- Xavier FE, Blanco-Rivero J, Sastre E, Caracul L, Callejo M, Balfagón G. Tranilast increases vasodilator response to acetylcholine in rat mesenteric resistance arteries through increased EDHF participation. *PLoS One* 2014; 9: e100356.
- Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, Cadnapaphornchai M, Knotek M, Schrier RW. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F1110-5.

- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 11: 371-386.
- Yang YY, Hsieh SL, Lee PC, Yeh YC, Lee KC, Hsieh YC, Wang YW, Lee TY, Huang YH, Chan CC, Lin HC. Long-term cannabinoid type 2 receptor agonist therapy decreases bacterial translocation in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2014; 61: 1004-1013.
- Yu PC, Kuo JS, Lin HC, Yang MC. Effects of endothelin in portal hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 1992; 83: 165-170.
- Zavala M, Castejón HV, Ortega PA, Castejón OJ, Marcano de Hidalgo A, Montiel N. Desequilibrio de aminoácidos plasmáticos en pacientes autistas y en sujetos con trastorno de déficit de atención o hiperactividad. *Rev Neurol* 2001; 33: 401–408.
- Zuccolo E, Dragoni S, Poletto V, Catarsi P, Guido D, Rappa A, Reforgiato M, Lodola F, Lim D, Rosti V, Guerra G, Moccia F. Arachidonic acid-evoked Ca²⁺ signals promote nitric oxide release and proliferation in human endothelial colony forming cells. *Vascul Pharmacol* 2016; 87: 159-171.